

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

RAFAEL CARLOS FERREIRA

**TOXICIDADE E AÇÃO ANTITUMORAL *IN VIVO* DO 4-(4-NITROBENZOATO)-
PIPERINOATO DE BUTILA, UM NOVO DERIVADO DA PIPERINA**

João Pessoa, PB

2019

RAFAEL CARLOS FERREIRA

**TOXICIDADE E AÇÃO ANTITUMORAL *IN VIVO* DO 4-(4-NITROBENZOATO)-
PIPERINOATO DE BUTILA, UM NOVO DERIVADO DA PIPERINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.
Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral

João Pessoa, PB

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F383t Ferreira, Rafael Carlos.

Toxicidade e ação antitumoral in vivo do
4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila, um novo
derivado da piperina / Rafael Carlos Ferreira. - João
Pessoa, 2019.

147 f.

Orientação: Marianna Vieira Sobral.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Atividade antiangiogênica. 2. Estresse oxidativo. 3.
Peixe-zebra. 4. Piperina. I. Sobral, Marianna Vieira.
II. Título.

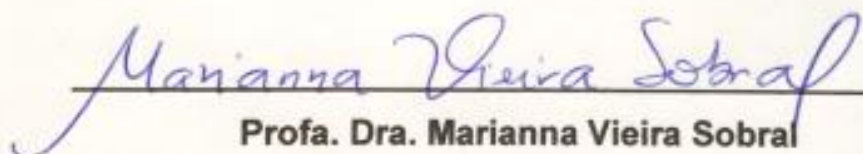
UFPB/BC

RAFAEL CARLOS FERREIRA

**TOXICIDADE E AÇÃO ANTITUMORAL *IN VIVO* DO 4-(4-NITROBENZOATO)-
PIPERINOATO DE BUTILA, UM NOVO DERIVADO DA PIPERINA**

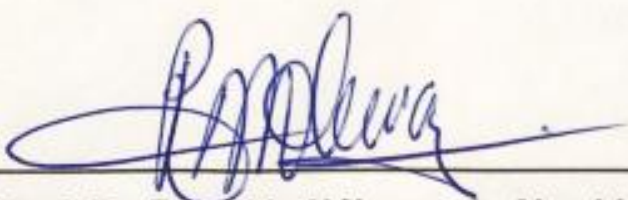
APROVADA EM: 27/02/2019

COMISSÃO EXAMINADORA



Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral

Orientadora



Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

Membro interno

Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio

Membro externo

À Francisca Mendes (*in memoriam*) e ao meu pai, Geraldo, dedico.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelo dom da vida e por sempre estar cuidando de mim.

À minha **família** por entender o sacrifício da distância. Em especial à minha tia **Eva Mendes**, por toda a sua doação e carinho ao cuidar do meu pai durante a minha ausência.

À família que a vida me deu, o bloco i 102, **Jéferson, Carol e Nayara**. Agradeço por vocês serem o meu lar, cuidarem de mim e me escutarem (e não são poucas as vezes que desabafo ou busco conselhos!), sempre me mostrando a solução para tudo. Amo muito vocês!

Aos meus amigos agregados do 102, **Vyctor, Jhayne e Jéssica**, pela amizade e torcida de sempre!

À minha boa e velha melhor amiga, **Ana Maria**. Só nós sabemos o que passamos e só nós conhecemos a força da nossa amizade! Te agradeço por ser fortaleza em momentos de fraqueza, alegria em momentos de tristeza e esperança quando não vejo mais solução.

A **Fagner** por seu o melhor amigo que alguém pode ter. Te agradeço por ser essa pessoa maravilhosa e pelos momentos ímpares que passamos juntos.

À minha amiga e fiel escudeira **Mel**, pelos bons momentos, pelas experiências compartilhadas, pelas alegrias e pelo ombro amigo. Agradeço pela confiança em ceder o DE-07 para a realização do meu trabalho. Você é muito especial e importante em minha vida!

Aos meus amigos **Aurélio, Silvana, Ramon, João Marçal, George, Jade, Flávia, Francisco, Augusto e Andrei**, pela amizade, carinho e apoio de sempre!

Aos meus amigos da pós-graduação do Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar), que conviveram diariamente comigo e compartilharam todas as dores e alegrias desses últimos dois anos: **Samia, Daiana, Thaís, Rawny, Tatyanna, Vivianne, Renata, Valgrícia, Ana Paula, Ana Luiza, Camyla e Thyago**. Muito obrigado por toda a ajuda e apoio, pela paciência e pelo carinho. Agradeço também ao **Prof. Dr. Hemerson Y. Ferreira Magalhães** e aos alunos da iniciação científica, **Antônio Júnior, Paulo e Isabelly**, pela disponibilidade em ajudar e pela torcida constante!

À **Tati Mota**, por ser exemplo de ser humano forte, guerreiro e destemido! Por toda a ajuda, independente de horário (sabemos) e pela amizade que temos

construído nos últimos anos. Obrigado por sempre fazer da tempestade, calma. Amo você soldado! Obrigado por tudo!

À minha orientadora **Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral** por toda a confiança em mim depositada e por toda orientação acadêmica desde a iniciação científica. Agradeço por me estimular a chegar cada vez mais longe e por irradiar alegria por toda parte!

Aos amigos do Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias (LabRisco) por toda a ajuda prestada durante a realização dos experimentos com o peixe-zebra, em especial ao **Filipi** e à **Juliana**. Muito obrigado!

Ao **prof. Dr. Davi Felipe Farias** pela receptividade em seu laboratório e pelos ensinamentos sobre o peixe-zebra. Sua inteligência e competência são admiráveis!

Aos **amigos do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB)**, em especial à minha **turma de mestrado** por terem me acolhido tão bem e por todo o encorajamento durante esse período.

A **Edvaldo, Fellyp, Marreiro e Thalisson**, por sempre me socorrerem e por serem amigos fiéis.

Aos **professores do PPgPNSB** por todo o conhecimento e experiências repassadas.

A **CAPES** pelo apoio financeiro.

"- Quem estará nas trincheiras ao teu lado?
- E isso importa?
- Mais do que a própria guerra".

Ernest Hemingway

FERREIRA, R. C. **TOXICIDADE E AÇÃO ANTITUMORAL *IN VIVO* DO 4-(4-NITROBENZOATO)-PIPERINOATO DE BUTILA, UM NOVO DERIVADO DA PIPERINA.** 2019. 147 f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

RESUMO

O câncer é caracterizado, principalmente, pela proliferação descontrolada de células que sofreram mudanças genéticas e/ou epigenéticas. A quimioterapia, uma das principais modalidades de tratamento dessa doença, está associada ao surgimento de resistência e a significativos efeitos adversos. Pensando nisso, diversas moléculas têm sido sintetizadas, visando o desenvolvimento de medicamentos mais efetivos e/ou com menor toxicidade. A piperina, um alcaloide encontrado em plantas do gênero *Piper*, possui significativa atividade antitumoral. Contudo, essa molécula está associada à significativa toxicidade. Desta forma, objetivando a potencialização do efeito antitumoral e/ou redução da toxicidade da piperina, foi sintetizado o derivado inédito 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07). O objetivo deste trabalho foi a avaliação da atividade antitumoral *in vivo* e da toxicidade não clínica do DE-07. No ensaio de toxicidade aguda, o tratamento com as doses de 300 e 2000 mg/kg, via intraperitoneal (i.p.), permitiu estimar a dose letal média (DL₅₀) em aproximadamente 1000 mg/kg. O uso do teste de toxicidade em embriões de peixe (teste FET), indicou que a concentração letal média (CL₅₀) do DE-07 é superior a 100 µg/mL. A exposição de embriões/larvas de peixe-zebra ao DE-07 não mostrou alterações nos indicadores de letalidade avaliados. O tratamento com DE-07 (300 mg/kg, i.p.) não aumentou a frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos Swiss. A avaliação da atividade antitumoral, utilizando o carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE), mostrou significativa redução dos parâmetros de viabilidade e total celular. Na avaliação dos possíveis mecanismos de ação antitumorais, o tratamento com DE-07 (50 mg/kg, i.p.) mostrou significativa redução da microdensidade vascular peritoneal, significativo aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) e aumento significativo da IL-1β, do TNF-α e da IL-4. A avaliação da toxicidade após tratamento com DE-07 não mostrou alterações nos índices do coração, fígado, rins, baço e timo. Foi observada redução dos consumos de água e ração, mas sem alteração significativa na avaliação ponderal. Discretas alterações histológicas no fígado foram evidenciadas. Redução da atividade sérica da aspartato aminotransferase (AST) também foi observada, mas dentro dos valores de normalidade para a espécie. A análise histológica dos rins não evidenciou nenhuma alteração morfológica nesses órgãos e, corroborando com esses resultados, não foram observadas alterações significativas nas concentrações séricas de ureia e creatinina. Em relação aos parâmetros hematológicos, foi observada leucocitose, acompanhada de linfocitose que, por sua vez, encontra-se dentro do intervalo de normalidade para a espécie. Em adição observou-se aumento do hematócrito (HCT) que não foi acompanhado de alterações nos demais parâmetros do eritograma e, desta forma, não possui significado clínico. Esses resultados permitem inferir que o DE-07 apresenta baixa toxicidade não clínica e significativa atividade antitumoral *in vivo* por induzir efeitos angiogênico, oxidativo e de modulação da resposta inflamatória no microambiente tumoral.

Palavras-chave: Atividade antiangiogênica, Estresse oxidativo, Peixe-zebra, Piperina.

FERREIRA, R. C. **TOXICITY AND *IN VIVO* ANTITUMORAL ACTION OF BUTYL 4-(4-NITROBENZOATE)-PIPERINOATE, A NEW DERIVATIVE OF THE PIPERINE.** 2019. 147 f. Dissertation (Masters in Natural and Synthetic Biological Products) - UFPB/CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

Cancer is characterized mainly by the uncontrolled proliferation of cells that have undergone genetic and/or epigenetic changes. Chemotherapy, one of the main treatment modalities for this disease, is associated with the emergence of resistance and significant adverse effects. Thinking about that, several molecules have been synthesized, aiming at the development of more effective drugs and/or with less toxicity. Piperine, an alkaloid found in plants of the genus *Piper*, has significant antitumor activity. However, this molecule is associated with significant toxicity. Thus, in order to potentiate the antitumor effect and/or reduce the toxicity of piperine, the inedited derivative butyl 4- (4-nitrobenzoate)-piperinoate (DE-07) was synthesized. The aim of this study was to evaluate the *in vivo* antitumor activity and non clinical toxicity of DE-07. In the acute toxicity test, treatment with doses of 300 and 2000 mg/kg intraperitoneally (i.p.) allowed the estimated mean lethal dose (LD₅₀) to be estimated at approximately 1000 mg/kg. The use of the fish embryo toxicity test (FET test) indicated that the mean lethal concentration (LC₅₀) of DE-07 is greater than 100 µg/mL. The exposure of zebrafish embryos/larvae to DE-07 did not show changes in the lethality indicators evaluated. Treatment with DE-07 (300 mg/kg, i.p.) did not increase the frequency of micronucleated erythrocytes in peripheral blood of Swiss mice. The evaluation of the antitumor activity, using Ehrlich ascitic carcinoma (CAE), showed a significant reduction in viability and total cell parameters. In the evaluation of possible antitumor mechanisms of action, treatment with DE-07 (50 mg/kg, i.p.) showed a significant reduction in peritoneal vascular microdensity, a significant increase in reactive oxygen species (ROS) and a significant increase in IL-1β, TNF-α and IL-4. Assessment of toxicity after treatment with DE-07 did not show changes in heart, liver, kidney, spleen and thymus indices. Reduction in water and feed intake was observed, but there was no significant change in weight evaluation. Discrete histological changes in the liver were evidenced. Reduction of serum aspartate aminotransferase (AST) activity was also observed, but within normal values for the species. Histological analysis of the kidneys did not show any morphological alterations in these organs and, corroborating these results, no significant alterations were observed in the serum concentrations of urea and creatinine. Regarding hematological parameters, leukocytosis was observed, accompanied by lymphocytosis, which, in turn, is within the range of normality for the species. In addition, an increase in hematocrit (HCT) was observed, which was not accompanied by changes in the other parameters of the erythrogram and, therefore, has no clinical significance. These results allow us to infer that DE-07 has low non clinical toxicity and significant *in vivo* antitumor activity because it induces antiangiogenic, oxidative and modulation of the inflammatory response in the tumor microenvironment effects.

Keywords: Antiangiogenic activity, Oxidative stress, Zebrafish, Piperine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características biológicas do câncer.	28
Figura 2. Etapas da carcinogênese.....	29
Figura 3. Mecanismos de ação antitumorais da piperina	54
Figura 4. Estrutura molecular da piperina (A) e do 4-(4-nitrobenzoato)-piperionato de butila (DE-07) (B)	56
Figura 5. Embriões e larvas de peixe-zebra expostos ao 4-(4-nitrobenzoato)-piperinato de butila (DE-07), na concentração de 100 µg/mL, ou aos controles meio E3 e DMSO (dimetilsulfóxido) a 0,5% durante 96 h.	74
Figura 6. Efeito do tratamento com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinato de butila (DE-07) e 5-fluorouracil (5-FU) na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	77
Figura 7. Efeito do tratamento com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinato de butila (DE-07) na histologia dos fígados de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich..	86
Figura 8. Efeito do tratamento com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinato de butila (DE-07) na histologia dos rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich..	88

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1. Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo da toxicidade e atividade antitumoral do 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07).....	63
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito do tratamento com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) e 5-fluorouracil (5-FU) em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich	76
Gráfico 2. Concentração de citocinas no lavado peritoneal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich submetidos ao tratamento com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) e 5-fluorouracil (5-FU).	79
Gráfico 3. Produção de espécies reativas de oxigênio após tratamento com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07).....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mortalidade após a administração de doses únicas (i.p.) do 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) em camundongos	72
Tabela 2. Efeito da exposição do 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) e do dimetilsulfóxido (DMSO) a embriões/larvas de peixe-zebra.....	73
Tabela 3. Número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) e ciclofosfamida.....	75
Tabela 4. Consumo de água e ração, e evolução ponderal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich submetidos ao tratamento com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) e 5-fluorouracil (5-FU).	81
Tabela 5. Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich submetidos ao tratamento com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) e 5-fluorouracil (5-FU)	82
Tabela 6. Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich submetidos ao tratamento com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) e 5-fluorouracil (5-FU)	83
Tabela 7. Índices dos órgãos de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich submetidos ao tratamento com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) e 5-fluorouracil (5-FU)	84

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU	5-fluorouracil
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASK1	Cinase 1 reguladora do sinal de apoptose
AST	Aspartato aminotransferase
CAE	Carcinoma ascítico de Ehrlich
CCEN	Centro de Ciências Exatas e da Natureza
CCL2	Quimiocina (motivo CC) de ligante 2
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração hemoglobínica corpuscular média
CL₅₀	Concentração letal média
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-2	Cicloxigenase-2
DBM	Departamento de Biologia Molecular
DCFH-DA	2'7 – dicloro dihidrofluoresceína diacetato
DE-07	4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila
DL₅₀	Dose letal média
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
ERK	Proteína cinase regulada por sinal extracelular
FdUMP	5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato
FdUTP	5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblastos 2
FUTP	5-fluorouridina-5'-trifosfato
GHS	<i>Globally Harmonized Classification System</i>
GPx	Glutathione peroxidase

Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HCT	Hematócrito
HE	Hematoxilina-eosina
HE02	2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperinoato de etila
HE03	2-oxo-2-(4-etilfenilamina)-piperinoato de etila
HER-2	Fator de crescimento epidérmico humano 2
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HIF-1α	Fator 1 α induzido pela hipóxia
Hpf	Horas pós-fertilização
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-15	Interleucina 15
IL-21	Interleucina 21
IL-23	Interleucina 23
IL-27	Interleucina 27
IL-33	Interleucina 33
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INF-γ	Interferon gama
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
JNK	Janus cinase
LabRisco	Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias
mAb	Anticorpos monoclonais
MAGE-3	Antígeno associado a melanoma 3
MDSCs	Células supressoras derivadas de mieloides
MMP	Metaloproteinases de matriz
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa beta

NK	<i>Natural killer</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NRP	Neuropilinas
NY-ESO-1	Carcinoma de células escamosas esofágicas de New York 1
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OncoFar	Laboratório de Oncofarmacologia
PBS	Solução tampão fostato
PD-1	Proteína de morte programada 1
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PIGF	Fator de crescimento placentário
PKD	Proteína cinase D
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Prx	Peroxirredoxina
PTP1B	Proteína tirosina fosfatase 1B
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RTK	Receptor tirosina cinase
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
TH₁	Linfócito T auxiliar tipo I
TH₂	Linfócito T auxiliar tipo II
TIMP	Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz
TKI	Inibidores de tirosina cinase
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Tregs	Células T reguladoras
Trx	Tiorredoxina
TSP	Trombospondina

UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UniPOM	Unidade de Produção de Organismos Não Convencionais
VCM	Volume corpuscular médio
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
2.1 Aspectos gerais do câncer	25
2.2 Angiogênese e microambiente tumoral	30
2.3 Estresse oxidativo no câncer.....	43
2.4 Farmacoterapia do câncer.....	46
2.5 O modelo de peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>) e os estudos de toxicidade	48
2.6 O modelo experimental de carcinoma ascítico de Ehrlich	50
2.7 Potencial biológico da piperina e dos seus derivados	52
3 OBJETIVOS.....	58
3.1 Objetivo geral	58
3.2 Objetivos específicos	58
4 MATERIAL E MÉTODOS	60
4.1 Local da pesquisa	60
4.2 Material.....	60
4.2.1 Substância teste.....	60
4.2.2 Substâncias e reagentes	60
4.2.3 Equipamentos	61
4.2.4 Animais.....	61
4.3 Métodos.....	63
4.3.1 Ensaios toxicológicos	64
4.3.1.1 Avaliação da toxicidade não clínica aguda em camundongos	64
4.3.1.2 Avaliação da toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra.....	64
4.3.1.3 Avaliação da genotoxicidade em camundongos	65
4.3.2 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich	65
4.3.2.1 Volume do tumor, massa tumoral, viabilidade celular e total celular	66
4.3.2.2 Investigação dos mecanismos de ação antitumorais	66

4.3.2.2.1 Avaliação do efeito antiangiogênico	66
4.3.2.2.2 Quantificação de citocinas no lavado peritoneal	67
4.3.2.2.3 Avaliação do estresse oxidativo: quantificação de espécies reativas de oxigênio	68
4.3.2.3 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich	68
4.3.2.3.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração	68
4.3.2.3.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos	69
4.3.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos	69
4.3.2.3.4 Análises histológicas	70
4.3.3 Análise estatística	70
5 RESULTADOS	72
5.1 Ensaio toxicológico	72
5.1.1 Avaliação da toxicidade não clínica aguda em camundongos	72
5.1.2 Avaliação da toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra	72
5.1.3 Avaliação da genotoxicidade em camundongos	75
5.2 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich	75
5.2.1 Volume do tumor, massa tumoral, viabilidade celular e total celular	75
5.2.2 Investigação dos mecanismos de ação antitumorais	77
5.2.2.1 Avaliação do efeito antiangiogênico	77
5.2.2.2 Quantificação de citocinas no lavado peritoneal	78
5.2.2.3 Avaliação do estresse oxidativo: quantificação de espécies reativas de oxigênio	80
5.2.3 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich	80
5.2.3.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração	80
5.2.3.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos	81
5.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos	83
5.2.3.4 Análises histológicas	84
6 DISCUSSÃO	90

7 CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS.....	108
ANEXOS	145

Introdução

INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado por um crescimento anormal das células no organismo, causado por múltiplas alterações no material genético e expressão gênica, que resulta em uma população de células que se dividem rapidamente e que podem provocar metástase. Essa doença causa morbidade significativa (FORCADOS et al., 2017) e representa a segunda maior taxa de mortalidade, após doenças cardiovasculares, em todo o mundo (KUMAR et al., 2014) com 8 milhões de mortes registradas em 2012 (FERLAY et al., 2015).

Atualmente, o tratamento do câncer envolve cirurgias, radioterapia e terapia sistêmica. As modalidades de terapia sistêmica incluem a terapia hormonal, a terapia alvo, a imunoterapia e a quimioterapia (DICKENS; AHMED, 2018), sendo, esta última, uma das principais escolhas para o tratamento do câncer (MARTINS et al., 2016). Contudo, a citotoxicidade dos agentes quimioterápicos para muitos tipos de células saudáveis em divisão leva a efeitos colaterais que incluem imunossupressão, fadiga, anemia, náusea, diarreia e alopecia (SCHÜNEMANN, ANKER; RAUCHHAUS, 2008; DEMARIA et al., 2017). Outro sério problema associado à quimioterapia é o fato de que as células tumorais têm desenvolvido resistência à múltiplas drogas. Dessa forma, faz-se necessária a busca por estratégias que garantam citotoxicidade direcionada às células tumorais e redução do desenvolvimento de resistência aos antineoplásicos (WU; ZHOU, 2015).

Nessa perspectiva, as plantas medicinais têm sido, historicamente, uma fonte importante de novos medicamentos antineoplásicos (AMIRKIA; HEINRICH, 2015), como o paclitaxel, das espécies vegetais do gênero *Taxus*, a vincristina e vimblastina da pervinca de Madagascar (*Catharanthus roseus*) e a camptotecina descoberta na árvore chinesa *Camptotheca acuminata* (KINGHORN et al., 2011; CRAGG; NEWMAN, 2013; ATANASOV et al., 2015). Em adição, as estruturas moleculares dos produtos naturais têm servido de inspiração para a geração de novos fármacos (CHEN et al., 2015), com diversos derivados sendo utilizados clinicamente para o tratamento de diversos tipos de tumores (MACIEL et al., 2007), como o docetaxel, o etoposídeo, o teniposídeo, a irinotecana, a topotecana e a vinorelbina (SISODIYA et al., 2013).

A piperina, amida piperidinil do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2(E)-4(E)-pentadienoico, é um alcaloide amida encontrado naturalmente em plantas

pertencentes à família Piperaceae, como *Piper nigrum* e *Piper longum*, sendo responsável pela pungência dessas espécies de pimenta (RESHMI; SATHYA; DEVI, 2010). Apresenta diversas atividades biológicas tais como anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral, conforme revisado por Meghwal e Goswam (2013). Contudo, essa molécula apresenta significativa toxicidade em roedores representada pela sua dose letal média (DL₅₀) em camundongos (PIYACHATURAWAT; GLINSUKON; TOSKULKAO, 1983) e indução de hepatotoxicidade (BEZERRA et al., 2006). Pensando nisso, avanços significativos têm sido feitos na descoberta de novas entidades químicas, baseadas no arcabouço da piperina (CHAVARRIA et al., 2016).

Nessa perspectiva, considerando o potencial terapêutico da piperina e a necessidade de obtenção de novas moléculas com atividade antitumoral e menor toxicidade, a equipe do Laboratório de Oncofarmacologia do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB/CCS/UFPB) realizou a avaliação da toxicidade e potencial antitumoral *in vivo*, em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE), de dois derivados semissintéticos da piperina: o 2-oxo-2-(4-etilfenilamina)-piperinoato de etila (HE03) e o 2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperinoato de etila (HE02). Essas moléculas apresentaram baixa toxicidade não clínica em camundongos, com significativa atividade antitumoral via mecanismos de ação que incluem a parada do ciclo celular e efeito antiangiogênico (SOUSA, 2015; SANTOS et al., 2018).

Assim, com o objetivo de maximizar os efeitos farmacológicos e/ou minimizar a toxicidade observada para a piperina e aumentar o arsenal de novas moléculas com potencial terapêutico para o tratamento do câncer, foi sintetizado o 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila, um derivado inédito da piperina, cujo presente trabalho se propôs a investigar a atividade antitumoral e os possíveis mecanismos de ação dessa molécula relacionados à angiogênese, ao microambiente tumoral e ao estresse oxidativo, bem como, avaliar a sua toxicidade utilizando camundongos Swiss e embriões/larvas de peixe-zebra.

Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais do câncer

As células saudáveis dos organismos humanos controlam cuidadosamente a produção de fatores de promoção ou inibição do crescimento, afim de garantir um controle rigoroso do número de células e da arquitetura e função do tecido (GUTSCHNER; DIEDERICH, 2012). No entanto, células que sofrem alterações genéticas e/ou epigenéticas em circuitos reguladores podem passar a manter uma sinalização proliferativa crônica (HANAHAN, 2014), gerando uma massa anormal de tecido conhecida como tumor (SHARMA et al., 2015) que pode ser classificado como benigno ou maligno (KUMAR et al., 2015).

Os tumores benignos são morfológicamente semelhantes às células do tecido de origem (TALMADGE; FIDLER, 2010), crescem lentamente e são bem delimitados (BIGNOLD, 2015). Em contrapartida, os tumores malignos possuem anormalidades morfológicas em relação ao tecido que lhes deu origem (TALMADGE; FIDLER, 2010), crescem rapidamente, possuem margens irregulares, destroem estruturas adjacentes e têm a capacidade de disseminação, por meio da corrente sanguínea e linfática, para locais distantes (BIGNOLD, 2015), em um processo de múltiplos passos denominado de metástase (ELLENBROEK; VAN RHEENEN, 2014), sendo este tipo de tumor caracterizado como câncer (KUMAR et al., 2015).

O câncer (tumor maligno) pode então ser definido como um grupo de doenças (GEORGAKOPOULOU; STEBBING; SCULLY, 2018), causadas por células desviantes que são incapazes de formar estruturas funcionais estáveis e que se multiplicam de forma descontrolada e invadem o organismo (FLOOR et al., 2012).

Atualmente, são reconhecidos mais de cem tipos distintos de câncer (NITULESCU et al., 2016) com base nas suas células de origem (KUMAR et al., 2015), sendo os mais comuns os cânceres de pulmão, colorretal, mama e próstata (KOENE et al., 2016). De maneira geral, os cânceres podem ser classificados, principalmente, em: (i) carcinomas: surgem das células epiteliais que formam os revestimentos das glândulas e as superfícies dos órgãos; (ii) sarcomas: surgem de células que compõem o tecido conjuntivo, como fibroblastos, ossos, músculos e células de gordura; e (iii) leucemias, linfomas e mielomas: surgem das células brancas do sangue e dos plasmócitos (SHIELDS, 2017).

O câncer é considerado como um importante problema de saúde pública (KE; SHEN, 2017; SIEGEL et al., 2018), tendo atingido uma boa proporção da população mundial em todas as gerações (ATAWODI, 2011). O crescente número de diagnósticos de câncer pode ser resultante do aumento da população e de seu envelhecimento (MILLER et al., 2016) com estimativas, para o ano de 2030, de mais de 22 milhões de novos casos (BRAY et al., 2012).

Uma forma de acessar indiretamente a incidência de câncer no Brasil é avaliando a frequência de hospitalizações de pacientes com diagnóstico principal de neoplasia no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRITO, 2016). Segundo os dados obtidos do Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH/SUS) da plataforma DATASUS-NET do Ministério da Saúde, foram registrados no Brasil, em 2018, 828.628 internações, sendo destas 58% (481.265) mulheres e 42% (347.363) homens (DATASUS, 2019). Para o biênio 2018-2019, estima-se que, no Brasil, ocorram 600 mil novos casos, para cada ano, dos quais os cânceres de próstata (68 mil) em homens e mama (60 mil) em mulheres serão os mais frequentes (INCA, 2018).

No que concerne ao número de óbitos, o câncer causou mais de 8,7 milhões de mortes em todo o mundo no ano de 2015, sendo a segunda principal causa de mortalidade (FITZMAURICE et al., 2017). As estimativas até o ano de 2030, é que sejam registradas cerca de 13,2 milhões de mortes no mundo por ano (FERLAY et al., 2015). No Brasil, entre as mulheres, o câncer de mama apresentou a maior taxa de mortalidade em 2015, seguido pelos cânceres de pulmão, cólon e reto, colo uterino e estômago. Já entre os homens, o principal tipo de câncer foi o de próstata, seguido pelos cânceres de pulmão, estômago, cólon e reto, e esôfago (GUERRA et al., 2017). Ainda, segundo a plataforma DATASUS-NET, foram registrados no Brasil em 2018, 67.705 óbitos, sendo 19% (12.880) na região Nordeste e 811 óbitos no estado da Paraíba (DATASUS/SIH/SUS, 2019).

Embora existam diferenças significativas entre os diferentes tipos de câncer, também existem propriedades compartilhadas por praticamente todos eles (MACHERET; HALAZONETIS, 2015). Por muitas décadas, pesquisadores tem se esforçado para especificar os traços característicos das células tumorais (PIETRAS; ÖSTMAN, 2010) que as permitem sobreviver além do seu tempo de vida (FEITELSON

et al., 2015). No ano de 2000, com revisão em 2011, Hanahan e Weinberg classificaram as “marcas” da célula cancerígena, os chamados *hallmarks* do câncer.

Os *hallmarks* são capacidades biológicas adquiridas pela célula tumoral durante o desenvolvimento do tumor (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011) e incluem (Figura 1): (i) proliferação sustentada, compreendendo a capacidade da célula de proliferar-se constantemente e na ausência de estímulos externos; (ii) evasão de supressão do crescimento, relacionada à perda de genes supressores de tumor ou ao acúmulo de mutações que tornam estes genes inativos (GUTSCHNER; DIEDERICH, 2012); (iii) resistência à morte celular pela geração de mutações genéticas ou modificações epigenéticas nos moduladores chave das vias de morte celular programada (SU et al., 2015); (iv) angiogênese sustentada, o que permite o fornecimento de oxigênio e nutrientes ao tumor em crescimento (ELLENBROEK; RHEENEN, 2014); (v) desregulação da energética celular para favorecer o estabelecimento e manutenção do estado tumorigênico (PAVLOVA; THOMPSON, 2016); (vi) inflamação crônica, associada a liberação de diversos mediadores inflamatórios que têm efeitos diretos nas células tumorais e no microambiente do tumor, regulando as extensas redes implicadas em várias características do câncer (PESIC; GRETEN, 2016); (vii) ativação da invasão e metástase que envolve diversos processos celulares, incluindo a degradação da matriz extracelular (ECM), a transição epitélio-mesenquimal (EMT), a angiogênese tumoral, o desenvolvimento de um microambiente inflamatório tumoral e a disfunção da maquinaria da morte celular programada (TALMADGE; FIDLER, 2010; SU et al., 2015); (viii) imortalidade replicativa, atribuída geralmente à ativação ou regulação positiva da telomerase (SHAY, 2016), permitindo que as células tumorais evadam-se da senescência ou crise/apoptose (HANAHAHAN; WEINBERG, 2015); (ix) instabilidade genômica, aumentando a taxa de mutação espontânea e permitindo a aquisição de alterações no DNA que promovem as características do câncer, impulsionando o desenvolvimento do tumor (PIKOR et al., 2013); e (x) evasão da destruição imune, relacionada a modificação da composição do microambiente pelas células tumorais para evitar o ataque do sistema imunológico, como, por exemplo, por meio do recrutamento de células imunossupressoras (YAACOUB et al., 2016).

Figura 1. Características biológicas do câncer

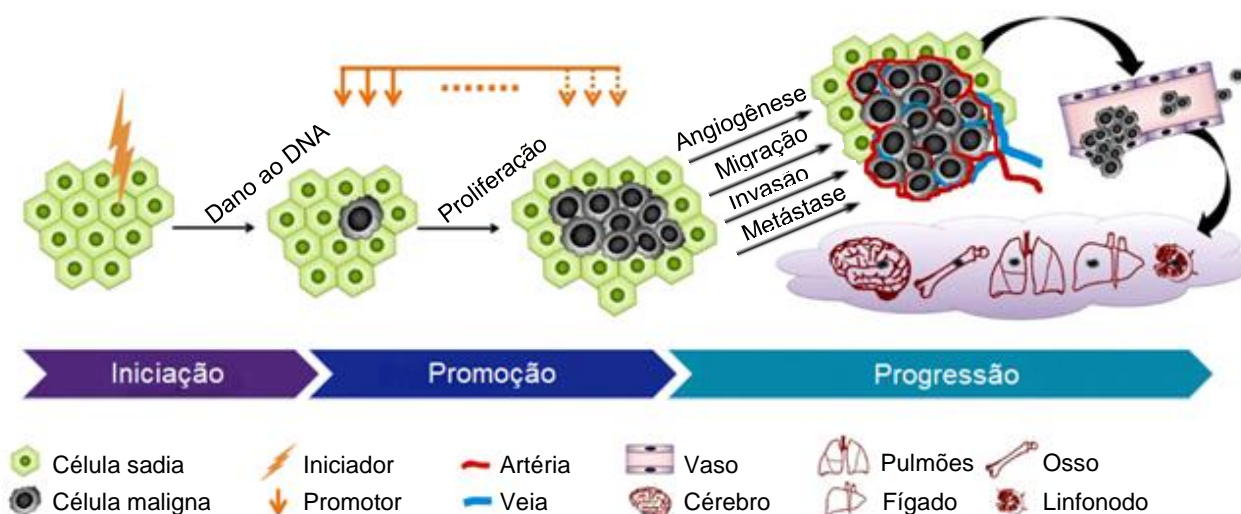


Fonte: Adaptado de Hanahan; Weinberg (2011).

A transformação maligna das células pode ser influenciada por fatores intrínsecos ou extrínsecos. Os fatores intrínsecos incluem aqueles que resultam em mutações devido a erros aleatórios na replicação do DNA, sendo responsáveis por cerca de 10 – 30% dos casos de câncer (WU et al., 2016), podendo-se citar, as mudanças hormonais extremas, a imunidade e os distúrbios genéticos herdados (TAN et al., 2016). Já os fatores extrínsecos correspondem aos fatores ambientais, tais como radiação ultravioleta, radiação ionizante e carcinógenos, que afetam as taxas de mutagênese, podendo atuar por meio do acúmulo de alterações genéticas durante a divisão celular para aumentar o risco de câncer (WU et al., 2016).

Desta forma, no processo de formação de um tumor, chamado de carcinogênese (FLOOR et al., 2012), ocorre a mudança de uma célula saudável para uma célula mutada, devido a um dano não reparado no DNA que pode ocorrer de maneira espontânea ou ser causado por agentes cancerígenos exógenos. Essa etapa é chamada de iniciação. Na etapa seguinte, a promoção, devido ao estímulo de agentes promotores, ocorre a expansão clonal da população celular iniciada na etapa anterior. Por fim, no estágio final, chamado de progressão, etapa irreversível do processo de carcinogênese, ocorrem danos adicionais ao genoma que resultam na formação do câncer (TANAKA et al., 2013).

Figura 2. Etapas da carcinogênese.



A iniciação é o primeiro passo no desenvolvimento do câncer. Uma vez que uma célula tenha sido afetada por um iniciador, ela é susceptível à promoção. Como a iniciação causa mudança genética permanente, qualquer célula filha proveniente da divisão da célula mutada também carregará a mutação. A promoção é a segunda etapa do processo carcinogênico. Os promotores referem-se aos compostos que promovem a proliferação da célula em um grande número de células filhas contendo a mutação criada pelo iniciador. A progressão é a terceira etapa e remete às transformações seriadas de um tumor benigno para a malignidade. Uma vez acionada, esta etapa é irreversível.

Fonte: Modificado de Liu et al., 2015.

Ao longo dos anos, descobriu-se que vários genes desempenham papel crítico na carcinogênese. Assim, mudanças irreversíveis no conteúdo genético celular podem modular tanto a expressão gênica quanto o funcionamento do produto translacional (proteínas) envolvido na regulação do crescimento e diferenciação celular. Nesse cenário, encontram-se a ativação de oncogenes, a exemplo do RAS (KHAN et al., 2018) e MYC (SHROFF et al., 2015; SCHAUB et al., 2018), e a inibição de genes supressores de tumores (SIEMANN; HORSMAN, 2015), como os que codificam as proteínas p53, a “guardiã do genoma” (KANG; ROSENWAKS, 2018), e a retinoblastoma (Rb) (PAGLIARONE et al., 2016) que estão envolvidas na regulação do metabolismo celular (GOMES et al., 2018) necessário para o crescimento do tumor, sobrevivência, evasão imune e metástase (NAGARAJAN et al., 2016). Além disso, defeitos nas vias de reparo de DNA, necessárias para preservar a integridade do genoma quando surgem danos (IYAMA; WILSON, 2013), permitem que as células tumorais acumulem alterações genômicas que contribuem para o seu fenótipo agressivo (DIETLEIN; THELEN; REINHARDT, 2014).

Pelo que foi exposto, é possível depreender que os tumores são mais do que simples massas de células em proliferação. Em vez disso, eles são tecidos complexos

compostos de múltiplos tipos de células distintas que participam de interações heterotípicas entre si. Além disso, células normais são recrutadas e atuam ativamente na tumorigênese contribuindo para o desenvolvimento e a expressão de certas capacidades marcantes, como a angiogênese (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

2.2 Angiogênese e microambiente tumoral

Para suportar a alta taxa proliferativa das células cancerígenas, os tumores precisam desenvolver rapidamente uma nova rede vascular (VIALARD; LARRIVÉE, 2017). Ao crescer além de um tamanho de aproximadamente 1-2 mm³ (ZHAO; IRAMINA; CHEN, 2015), o tumor estimula a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (HUANG; ZHANG; HU, 2017) em um processo altamente organizado de crescimento e diferenciação celular chamado de angiogênese (RIZOV; ANDREEVA; DIMOVA, 2017).

A angiogênese é componente de processos fisiológicos e patológicos, como o desenvolvimento embrionário, o reparo tecidual (VIALARD; LARRIVÉE, 2017) e a artrite reumatoide (ELSHABRAWY et al., 2015). No câncer, esse mecanismo é importante, pois além de fornecer oxigênio e nutrientes ao tumor, também permite a remoção dos produtos do seu metabolismo, (JIMÉNEZ-VALERIO; CASANOVAS, 2017), instabilidade genética, inflamação, ruptura microambiental, invasão e metástase (WANG et al., 2015).

No processo de angiogênese, os novos vasos sanguíneos são criados a partir de vasos quiescentes que exibem um fenótipo maduro. Quando as células endoteliais são ativadas em resposta a um estímulo pró-angiogênico, a membrana basal é degradada, os pericitos se desprendem e uma célula endotelial especializada, denominada célula ponta (*tip cell*) direciona o alongamento do novo broto vascular guiando as chamadas *stalk cells*, ou células da haste, que proliferam-se e alongam o vaso. O fluxo sanguíneo é então estabelecido pela união de dois novos vasos adjacentes e aqueles não perfundidos, regredirão. Eventualmente a membrana basal será recriada, a cobertura de pericitos será restaurada e os vasos retornarão a um estado quiescente (JOHNSON; WILGUS, 2014).

Comparado aos vasos sanguíneos do tecido, a rede vascular tumoral demonstra características morfológicas atípicas sendo caracterizada por vasos

sanguíneos dilatados, tortuosos e desorganizados. A imaturidade vascular e a falta de associação de células murais conduzem à permeabilidade excessiva, fraca perfusão e hipóxia aumentada (VIALARD; LARRIVÉE, 2017).

Na homeostase, os vasos sanguíneos se formam apenas quando são necessários, pois ocorre um equilíbrio entre os fatores pró e antiangiogênicos, o que permite a manutenção da vasculatura em estado quiescente, mas preparada para mudanças dinâmicas rápidas em resposta a perturbações na sinalização no microambiente causadas por condições como a inflamação (KIM et al., 2017; MOUSA; DAVIS, 2017).

Dentre os fatores pró-angiogênicos destaca-se o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) (VASALA et al., 2017) que se expressa em níveis elevados em muitos tipos de carcinomas (FALCON et al., 2016). A sinalização desse fator de crescimento em células tumorais é mediada por receptores de VEGF do tipo tirosina cinase (RTKs) e neuropilinas (NRPs). As NRPs têm um papel importante nesta sinalização devido à sua capacidade de interagir e afetar a função de múltiplos RTKs e integrinas (GOEL; MERCURIO, 2013). O sinal transduzido pela ligação do VEGF aos seus receptores culmina na indução da angiogênese, integrando a regulação da sobrevivência, proliferação e migração das células endoteliais. O VEGF também é capaz de modular a permeabilidade das células endoteliais e a função de barreira facilitando o aumento da passagem de proteínas (em particular fibrina e outros fatores de coagulação), de células inflamatórias (granulócitos polimorfonucleares, linfócitos, monócitos e fibroblastos) e a diapedese das células tumorais na vasculatura ou extravasamento da vasculatura aos locais metastáticos (FALCON et al., 2016; SHERBET, 2017).

Além do VEGF, outros mediadores envolvidos na promoção da angiogênese podem ser citados, tais como: o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e o fator de crescimento transformante beta (TGF- β) (MARACLE; TAS, 2014). Já dentre os fatores inibidores da angiogênese encontram-se os interferons α e β , a endostatina, a trombospondina (TSP), a decorina, a angiostatina, interleucinas e os inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz (TIMP) (YADAV et al., 2015; CASTAÑEDA-GILL; VISHWANATHA, 2016).

Outra molécula que exerce papel importante na progressão do tumor por regulação da angiogênese, é o óxido nítrico (NO) (CHOUDHARI et al., 2012), um radical diatômico gasoso, de meia-vida curta e de alta permeação nas membranas biológicas (SCICINSKI et al., 2015). O NO é produzido na célula endotelial vascular a partir da oxidação da L-arginina pela ação das NOS (óxido nítrico sintases) e atua na indução e promoção da angiogênese por: (i) dilatação de vasos arteriolares; (ii) liberação de VEGF; (iii) aumento da produção de prostaglandina E2 (PGE2), resultando em aumento da permeabilidade vascular tumoral; e (iv) ativação da ciclooxigenase-2 (COX-2) que estimula a produção de fatores pró-angiogênicos e prostaglandinas (CHOUDHARI et al., 2013).

No câncer, a angiogênese encontra-se ativada continuamente como resultado do desequilíbrio permanente entre esses fatores (VORON et al., 2014) em virtude de um excesso de sinalização pró-angiogênica e/ou uma deficiência de sinalização antiangiogênica levando ao desenvolvimento da vasculatura tumoral anormal (GOEL et al., 2011).

Então, o aumento da densidade vascular no tumor e, conseqüentemente, o sobrepujamento das limitações ao crescimento impostas por um suprimento sanguíneo insuficiente, são permitidos graças à transição da fase avascular, do desenvolvimento tumoral, para a fase vascular, um evento denominado de “switch” angiogênico (WICKI; CHRISTOFORI, 2008) que estimula o brotamento contínuo para a formação de novos vasos, sustenta a expansão do crescimento neoplásico e o desenvolvimento metastático (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

Considerando que o recrutamento de novos vasos sanguíneos é uma estratégia importante para o desenvolvimento do tumor (MURPHY; BEGUM; HYNES, 2015), numerosos agentes que estão atualmente em prática clínica e outros em desenvolvimento clínico visam interferir com os sinais que promovem a angiogênese (HARRIS; GENERALI, 2014), constituindo uma das mais importantes estratégias antitumorais (LI et al., 2017).

A terapia antiangiogênica pode ser utilizada isoladamente (monoterapia) ou em combinação com quimioterapia padrão ou quimiorradioterapia (EL-KENAWI; EL-REMESSY, 2013; TREPS et al., 2016), concentrando-se principalmente na inibição da sinalização do VEGF, uma vez que este foi revelado como um regulador chave da angiogênese. Esses agentes podem ser: (i) anticorpos neutralizantes para o VEGF,

como o bevacizumab; (ii) inibidores de tirosina cinase (TKI), que atuam bloqueando a ativação do VEGFR e de outras vias de sinalização em células endoteliais e pericitos, como o sunitinib que visa VEGFR1-3, PDGFR, c-kit e Flt3, ou sorafenib que tem como alvo o VEGFR1-3, o PDGFR, o c-kit e Raf-quinases; (iii) inibidores da via mTOR, como temsirolimus e everolimus (VORON et al., 2014; WANG; JAIN; BATCHELOR, 2017); e (iv) receptores solúveis, como o aflibercepte que se liga ao VEGF-A e VEGF-B e ao fator de crescimento placentário 1 e 2 (PIGF 1 e 2) e impede a ativação de seus respectivos receptores (CIOMBOR; WU; GOLDBERG, 2015; SOBOLEWSKA et al., 2018).

Os tumores têm sido reconhecidos como estruturas complexas, desorganizadas e caóticas, onde as células tumorais coexistem e coevoluem com seu estroma (SCHAAF, GARG, AGOSTINIS, 2018). Os elementos estruturais e funcionalmente essenciais de um estroma tumoral incluem os fibroblastos, miofibroblastos, células neuroendócrinas, células adiposas, células imunes e inflamatórias, redes vasculares sanguíneas e linfáticas, e a matriz extracelular (CHEN et al., 2015) que, juntamente com as células neoplásicas, compreendem o microambiente tumoral (SPANO; ZOLLO, 2012).

No tecido saudável, o estroma funciona como a principal barreira contra a tumorigênese (JUNTILLA; SAUVAGE, 2013). Na tentativa de destruição do tumor, em uma fase chamada de eliminação, o sistema imune inato e adaptativo reconhece e destrói com sucesso a maioria das células tumorais, mantendo sob controle essa população de células. No entanto, algumas células tumorais residuais podem permanecer despercebidas e assintomáticas por um longo período de tempo, que varia de cinco a mais de 20 anos. Este período de tempo define um segundo estágio chamado de equilíbrio, no qual uma pequena população de células é mantida invariavelmente (LÓPEZ; SEOANE; SANJUÁN, 2017), representando um tipo de dormência do tumor em que o seu crescimento é controlado pela imunidade. Por fim, em uma fase denominada de escape, as células tumorais que adquiriram a capacidade de contornar o reconhecimento imunológico e/ou a destruição, emergem como tumores visíveis em crescimento progressivo. A progressão da fase de equilíbrio para a de escape pode ocorrer porque a população de células tumorais muda em resposta às funções da edição do sistema imunológico e/ou porque o sistema imune

do hospedeiro muda em resposta ao aumento da imunossupressão induzida pelo câncer ou deterioração do sistema imunológico (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011).

Nesse contexto, as células tumorais contribuem para a geração e modificação do microambiente tumoral (SPANO; ZOLLO, 2012), criando o seu próprio ambiente protetor (WANG, FRANCO, HO, 2017). Para isso, as células tumorais reprogramam o microambiente e formam uma forte rede imunossupressora para limitar a capacidade das células T de erradicar as células tumorais (WU et al., 2015), ou seja, embora o sistema imunológico tenha a capacidade de gerar respostas antitumorais, os mecanismos de supressão imune podem prevenir esse processo (JUNTTILA; SAUVAGE, 2013).

Dentre as células imunes do microambiente tumoral, encontram-se as *células T CD4⁺ auxiliares* (células T *helper* – Th) que são caracterizadas por diferentes perfis de citocinas que são usados para definir seus subconjuntos (RAPHAEL et al., 2014). Classicamente essas células são divididas em células Th1, que iniciam uma resposta imune celular, ou células Th2, que iniciam uma resposta imune humoral (REUTER; POMBO; BETTS, 2012).

As *células Th1* são essenciais para a imunidade antitumoral (XU, 2014). Junto às citocinas que produzem, estão fortemente associadas a um bom resultado clínico para todos os tipos de câncer (FRIDMAN et al., 2012) e dentre essas citocinas incluem-se o interferon γ (IFN- γ), as interleucinas 2 (IL-2), 15 (IL-15) e a 21 (IL-21) (RAMÍREZ; HUITINK; CATA, 2013). Já as *células Th2* estão relacionadas à promoção da proliferação de células tumorais (HONG et al., 2008; MA; LIU; WANG, 2014) envolvendo citocinas como as interleucinas 4 (IL-4), 10 (IL-10), 8 (IL-8) e a 13 (IL-13) (RAMÍREZ; HUITINK; CATA, 2013).

Um outro componente crucial do infiltrado de células imunes no microambiente tumoral são os macrófagos (FAN et al., 2014). Os macrófagos em tumores, geralmente conhecidos como macrófagos associados a tumores ou TAMs, podem ser regulados positivamente no compartimento estromal de vários tumores sólidos participando do crescimento, angiogênese e metástase (GOSWAMI et al., 2017). O IFN- γ , produzido por células Th1, induz o que é chamado de ativação clássica de macrófagos, na qual os macrófagos, então denominados M1, adquirem a capacidade de destruir micróbios fagocitados e células tumorais. Em contraste, as citocinas Th2 induzem um tipo diferente de resposta de macrófagos, chamada ativação alternativa,

e estes macrófagos, denominados M2, promovem o reparo tecidual, angiogênese e cicatrização. Foi postulado que os macrófagos de ativação clássica servem para eliminar tumores, enquanto que os macrófagos alternativamente ativados promovem o desenvolvimento e o crescimento do tumor (MARTINEZ; GORDON, 2014; GUTKIN; SHURIN, 2017).

A imunossupressão, assim como a inflamação crônica e a angiogênese, é promovida por uma comunicação dinâmica entre as células tumorais e os demais elementos do microambiente tumoral. Isso se dá por meio do contato direto entre esses componentes ou pela liberação de fatores solúveis que incluem citocinas, quimiocinas, eicosanoides, fatores de crescimento e enzimas de remodelação da matriz (JUNTILA; SAUVAGE, 2013; WANG; DUBOIS, 2015; SCHAAF, GARG, AGOSTINIS, 2018), culminando em mudança das respostas imunitárias Th1 para Th2, função de apresentação de antígeno defeituosa, atividade citotóxica prejudicada de células T CD8⁺ e *natural killer* (NK) e aumento de células imunossupressoras, como as células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs) e células T reguladoras (Tregs) (WANG; DUBOIS, 2015), fazendo com que o tumor não só escape do sistema imune do hospedeiro, mas ele efetivamente se beneficie das células infiltradas, modificando suas funções para criar o microambiente favorável à progressão tumoral (WHITESIDE, 2008).

As citocinas estão intrinsecamente envolvidas em todas as reações imunes (LIPPITZ, 2013), podendo ter efeitos pró-inflamatórios ou imunossupressores, atividade promotora ou inibitória de crescimento e podendo sustentar ou prevenir a diferenciação celular (ROYER; BLANCHARD, 2015). No câncer, a expressão e a atividade dessas moléculas encontram-se desreguladas, contribuindo para a inflamação crônica (YAO et al., 2016).

As citocinas são pequenas glicoproteínas produzidas principalmente por macrófagos, linfócitos B e T e mastócitos, mas fibroblastos e células endoteliais também podem produzi-las. Elas podem pertencer ao grupo das interleucinas (ILs), dos interferons (INFs) ou à família do fator de necrose tumoral (TNF). Uma vez liberadas, as citocinas podem atuar a nível local ou sistêmico, dependendo de células e receptores efetores adjacentes e proximidade de leitos vasculares. A comunicação parácrina também pode ser observada, uma vez que a diferenciação do subtipo de células T *helper* pode ser influenciada por uma predominância de citocinas locais,

como ocorre em altas concentrações de IL-4 e interleucina 33 (IL-33) que conduzem preferencialmente à produção de subconjuntos de células Th2 (PAUL; ZHU, 2010; HARVEY; MORGAN, 2014).

A família IL-1 é um grupo de citocinas pleiotrópicas com múltiplos efeitos locais e sistêmicos, que regulam as respostas imunes inatas e adaptativas. Elas fornecem sinais pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios e algumas também estão envolvidas na modulação fisiológica dos processos homeostáticos nas células parenquimatosas (STRIZ, 2017). Dentre as muitas respostas imunológicas iniciadas por essa família de citocinas incluem-se a febre, a síntese de prostaglandinas, o influxo e ativação de neutrófilos, a ativação de células T e a produção de citocinas, a ativação de células B e a produção de anticorpos e a proliferação de fibroblastos e produção de colágeno (DINARELLO, 2011; KEYEL, 2014). Das citocinas dessa família, as interleucinas 1 α (IL-1 α) e 1 β (IL-1 β) são as duas principais formas (AREND; PALMER; GABAY, 2008; HU et al., 2017).

Tanto a IL-1 α quanto a IL-1 β são inicialmente sintetizadas como proteínas precursoras que podem ser clivadas enzimaticamente (LUKENS; GROSS; KANNEGANTI, 2012). A IL-1 α é constitutivamente expressa em células que formam barreiras biológicas, tais como células epiteliais, queratinócitos e células endoteliais (JESUS; GOLDBACH-MANSKY, 2014). Uma das suas principais propriedades é a mediação das fases iniciais da inflamação estéril e da resposta de T *helper* 17 (Th17) (TAN et al., 2018).

Ao contrário da IL-1 α , a IL-1 β é expressa apenas por um pequeno número de tipos celulares, incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas (TAN et al., 2018), devendo ser clivada proteoliticamente em sua forma ativa (JESUS; GOLDBACH-MANSKY, 2014). Tem propriedades biológicas semelhantes às da IL-1 α devido à sua ligação ao mesmo receptor, IL-1R1, incluindo, entre as suas principais funções, a mediação da inflamação e a regulação da resposta imune via ativação de Th1 e Th17 (TAN et al., 2018).

Tanto a IL-1 α como a IL-1 β , por meio da ligação ao IL-1R1, podem estimular as vias de sinalização do Fator nuclear kappa B (NF- κ B), Janus cinase (JNK) e p38 MAPK, resultando na fosforilação de várias proteínas envolvidas na transcrição de genes inflamatórios e catabólicos, como interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8),

quimiocina (motivo CC) de ligante 2 (CCL2) e COX-2 (GABAY; LAMACCHIA; PALMERET, 2010; WEBER; WASILIEW; KRACHT, 2010; JOHNSON et al., 2015).

A IL-1 está envolvida em todas as fases do processo maligno, como tumorigênese, invasividade e progressão tumoral, como também na ativação e/ou supressão da imunidade antitumoral (VORONOV; APTE, 2015).

Essa interleucina pode estimular a propagação de mutações iniciadas por espécies reativas de oxigênio (ROS) ou NO produzidos por fagócitos, outras células do microambiente ou células epiteliais mutantes. Pode também potencializar a invasividade de células malignas por meio da estimulação de fatores de crescimento, da angiogênese e da motilidade de células tumorais, conduzindo finalmente à metástases (VORONOV; APTE, 2015).

Contudo, efeitos antitumorais da IL-1 já são bem reportados. Em alguns tipos de câncer, IL-1 β elimina as células malignas por estimular a imunidade antitumoral e aumentar os efeitos da quimioterapia (LEE et al., 2014). Ohkura e colaboradores (1990) observaram que a IL-1 β apresenta efeito antiproliferativo em carcinoma pulmonar de Lewis, isoladamente e em combinação com o fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Ciolli e colaboradores (1991) demonstraram que a injeção peritumoral de interleucina 1 humana recombinante resultou em aumento acentuado no tempo de sobrevivência dos animais experimentais e em inibição do crescimento tumoral metastático no fígado e no baço. Adicionalmente, em trabalho realizado por Jia e Kleinerman (1991), a IL-1 apresentou efeito antiproliferativo contra linhagens de osteossarcoma, apresentando efeito sinérgico de inibição do crescimento tumoral com o IFN- γ .

A IL-4 é uma citocina pleiotrópica (BOSURGI et al., 2017) produzida predominantemente por células Th2, mas também por macrófagos, células dendríticas, mastócitos, células T *natural killer* (NKT), células NK, basófilos e eosinófilos (KOLLER et al., 2010; SUZUKI et al., 2015), cujas ações envolvem a regulação da produção de anticorpos, hematopoiese e inflamação, promoção da diferenciação de células T *hepler naive* em células Th2, redução da produção de células Th1 (RAMÍREZ; HUITINK; CATA, 2013) e a ativação alternativa de macrófagos para produzir o fenótipo M2, que está crucialmente envolvido na imunidade do tipo 2 (LUZINA et al., 2012; SKARIA et al., 2016).

Existe uma relação entre a IL-4 e condições patológicas como a inflamação alérgica (OESER et al., 2015; RIVAS et al., 2016) e a resposta imune à parasitas (PELLY et al., 2016; WU et al., 2018). No câncer, evidências clínicas sugerem que a IL-4 atua como uma citocina promotora do tumor. Dados da literatura demonstraram que a administração de um anticorpo neutralizante contra IL-4 aumenta a imunidade antitumoral e retarda a progressão tumoral em modelo animal. Foi visto também que o bloqueio de IL-4 reduziu a geração de macrófagos M2 imunossupressivos e de células supressoras mielóides e causou o aumento de linfócitos T citotóxicos específicos para tumores (ITO et al., 2017).

Contudo, efeitos antitumorais da IL-4 também foram reportados. Experimentalmente, tumores geneticamente modificados para expressar a IL-4 foram rejeitados, enquanto os tumores parentais cresceram progressivamente. O mecanismo pode residir no efeito da IL-4 na maturação das células precursoras mieloides e, portanto, na iniciação mais eficiente das células T (LI; CHEN; QIN, 2009). Em estudo realizado por Redmond e colaboradores (1992), o tratamento com a IL-4 de camundongos transplantados com carcinoma pulmonar de Lewis esteve associado à redução do volume tumoral e aumento da média de sobrevida dos animais. Outros dados da literatura mostram a atividade antitumoral dessa citocina ao demonstrar que houve redução significativa do volume e peso tumoral do melanoma B16F10 em camundongos transgênicos hiperexpressivos à IL-4. Tal efeito foi acompanhado de alta expressão de proteínas pró-apoptóticas como as caspases clivadas 3, 8 e 9, Bax, p53 e p21, e redução da expressão de proteínas antiapoptóticas como a Bcl-2. Em adição, estudos *in vitro* mostraram que a IL-4 inibiu a proliferação de células SK-MEL-28 (melanoma humano) e B16F10 (melanoma murino) via ativação da via de sinalização STAT6, mediada por p21 (TOI; BICKNELL; HARRIS, 1992; LEE et al., 2016a). Em adição, também foi relatado que a IL-4 possui potente efeito inibidor da angiogênese em testes *in vivo* e *in vitro* (VOLPERT et al., 1998).

A IL-10 é o principal membro da superfamília IL-10 (BERTI et al., 2017), produzida por células de imunidade inata e adaptativa, incluindo células dendríticas, macrófagos, mastócitos, células NK, eosinófilos, neutrófilos, células B e subtipos de células T, especialmente as células Th2 e Treg. É conhecida por ser uma citocina pleiotrópica e potente anti-inflamatória e imunossupressora (MOORE et al., 2001; MOLLAZADEH et al., 2017) que inibe a produção de citocinas Th1 pró-inflamatórias

que, por sua vez, levam à diminuição da maturação dos leucócitos e ao recrutamento de células durante a inflamação (SHARMA; TOOR, 2017).

O papel da IL-10 na patogênese e desenvolvimento tumoral é extremamente controverso até o momento. Alguns estudos indicam que a IL-10 contribui positivamente para o crescimento, promoção e para o escape imune do tumor, diminuindo a resposta imune antitumoral no microambiente tumoral (MANNINO et al., 2015). Tem sido relatado, por exemplo, que macrófagos M2 mostraram-se capazes de promover a proliferação e tumorigênese das células de glioma *in vitro* e *in vivo* por meio da secreção de IL10 dependente da ativação da via de sinalização JAK2/STAT3 (QI et al., 2016).

No entanto, outros estudos mostraram que a IL-10 contribui para a erradicação e supressão da angiogênese e metástase (MANNINO et al., 2015). O efeito antitumoral da IL-10 pode estar relacionado à sua capacidade de modular outras citocinas ou mediadores pró-tumorais incluindo o VEGF, IL-1 β , TNF- α e IL-6 (LEE et al., 2016b). É o que ocorre, por exemplo, no aumento da vigilância imunológica contra tumores mediado por essa citocina, ao induzir a expressão de IFN- γ facilitando maior infiltração de células T e maior apresentação de antígeno (MUMM et al., 2011).

A família de citocinas IL-12 é constituída pela interleucinas 12 (IL-12), 23 (IL-23), 27 (IL-27) e 35 (IL-35). Elas contribuem para a regulação do sistema imune contra doenças infecciosas, autoimunes e cânceres (BEHZADI; BEHZADI; RANJBAR, 2016).

A IL-12 é uma citocina pleiotrópica, cujas ações criam uma interconexão entre a imunidade inata e adaptativa (LASEK; ZAGOŹDŹON; JAKOBISIAK, 2014), sendo ela produzida por macrófagos, monócitos, células dendríticas, granulócitos e células B (ZUNDLER; NEURATH, 2015).

Essa citocina é uma das principais orquestradoras da resposta imune do tipo Th1 contra o câncer (LASEK; ZAGOŹDŹON; JAKOBISIAK, 2014). Atua promovendo a diferenciação de células Th1 e induzindo a produção de IFN- γ (YAN; SMYTH; TENG, 2018), além de induzir a expressão de IL-21, TNF- α e IL-2 (YU et al., 2015). Acredita-se que as atividades antitumoral e antimetastática da IL-12 sejam mediadas pela ativação de STAT4 pelo IFN- γ (COLOMBO; TRINCHIERI, 2003; ZUNDLER; NEURATH, 2015; YAN; SMYTH; TENG, 2018).

O potencial terapêutico da IL-12 foi investigado em numerosos modelos experimentais de câncer. De fato, a adição de IL-12 exógena tem sido considerada

como uma opção terapêutica considerando os resultados promissores obtidos em modelos não-clínicos. Contudo, ensaios clínicos destacaram efeitos colaterais muito graves em pacientes que recebem IL-12 sistêmica, associado apenas a uma insignificante regressão do tumor (CROXFORD; KULIG; BECHER, 2014).

A CCL2 pertence a um grupo de citocinas de baixo peso molecular com atividade quimioatrativa, coletivamente conhecidas como quimiocinas (LIM et al., 2016). Essas moléculas são mediadoras da migração celular dirigida, como o recrutamento de leucócitos durante a inflamação, bem como ativadores de vias celulares importantes como, por exemplo, as vias de sinalização JAK ou STAT (ROBLEK et al., 2016).

Embora as células tumorais possam ser a principal fonte de CCL2 (YOSHIMURA et al., 2013) no microambiente tumoral, as células estromais, sendo elas os fibroblastos, as células endoteliais, os mastócitos e os queratinócitos, também têm a capacidade de produzi-la (MAI et al., 2018).

Dentre suas funções, a CCL2 facilita o processo de migração e infiltração de vários sistemas celulares, como monócitos, células NK, linfócitos T e células de memória e, no contexto do câncer, desencadeia a proliferação de células tumorais (VAKILIAN et al., 2017), a progressão tumoral (MISHRA et al., 2015; CHEN et al., 2016b) e a metástase (QIAN et al., 2011; TSAUR et al., 2015; KITAMURA et al., 2015; MAOLAKE et al., 2017). Além disso, a ausência de CCL2 está associada a uma profunda redução no número de células precursoras endoteliais na medula óssea e na circulação, que pode suprimir angiogênese tumoral (CHEN et al., 2016b). Em adição, foi reportado que a CCL2 derivada de tumor medeia a resistência à radioterapia no adenocarcinoma ductal pancreático (KALBASI et al., 2017).

Em contraposição, relatos indicam que a CCL2 pode cessar a formação tumoral (ROLLINS; SUNDAY, 1991), regular negativamente a metástase (TAKAHASHI et al., 2009) e, ainda, aumentar a eficácia da quimioterapia (LONG et al., 2016). Essa quimiocina pode atrair células imunes antitumorais que são necessárias para a imunovigilância eficiente, de tal forma que a inibição da CCL2 pode promover a neocarcinogênese, bem como o desenvolvimento de metástases. Assim, é possível que a CCL2 possa melhorar a morte mediada por neutrófilos de células tumorais (LAVENDER et al., 2017). Tal efeito foi evidenciado por Granot e colaboradores (2011) cujo trabalho mostrou que neutrófilos associados ao tumor adquiriram um fenótipo

citotóxico e atuaram na destruição de células tumorais após estimulação pelo fator estimulador de colônias de granulócitos e CCL2 secretados pelo tumor.

O TNF- α é uma citocina com ações pleiotrópicas na regulação das respostas imunes associadas à inflamação (CRUSZ; BALKWILL, 2015) e que é produzida principalmente por macrófagos ativados e outros tipos de células imunes, como linfócitos T, células NK e neutrófilos (ZHOU; LI; ZHOU, 2017). Foi inicialmente identificado e designado pela sua capacidade de destruir células tumorais, sendo atualmente considerado um fator chave na regulação de numerosos processos fisiológicos e patológicos tais como inflamação, autoimunidade e neurodegeneração (CHEN et al., 2016a).

Essa citocina ativa macrófagos no local da inflamação, induzindo a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias que exacerbam a inflamação. A atividade do TNF- α nas células epiteliais prejudica a função de barreira e promove a permeabilidade às bactérias comensais. Nos fibroblastos, o TNF- α leva à expressão de metaloproteinases e à síntese de colágeno, promovendo assim a fibrose tecidual. Nas células endoteliais, o TNF- α atua no aumento das moléculas de adesão expressas nos vasos sanguíneos, levando subsequentemente ao aumento da infiltração de leucócitos. Pode também induzir a apoptose das células endoteliais (BERRAONDO et al., 2018).

No contexto do câncer, os mecanismos de ação antitumorais do TNF- α incluem: (i) apoptose celular por ligação a receptores de superfície de células tumorais; (ii) ativação de células T-efetoras (macrófagos e células NK) pelo bloqueio de células T-Reg que são imunossupressores; (iii) indução do colapso da microvasculatura tumoral por meio da modulação das células endoteliais e ruptura da neoangiogênese incluindo a disrupção da vasculatura tumoral; (iv) promoção dos macrófagos associados a tumores ao estágio anti-tumoral M1; (v) atração e estimulação de neutrófilos e monócitos para locais de ativação de respostas imunes antitumorais; e (vi) regulação negativa da expressão de IL-13 por células eosinofílicas e inibição da diferenciação de monócitos induzida por tumor a fenótipos imunossupressores (JOSEPHS et al., 2018).

No entanto, está sendo amplamente aceito que a exposição crônica ao TNF- α promove proliferação de células tumorais, angiogênese e disseminação (SUAREZ-CARMONA et al., 2017). De acordo com Tang e colaboradores (2017) o TNF- α

promove invasão e metástase através da via de sinalização NF- κ B em carcinoma oral de células escamosas. Em adição, foi demonstrado que essa citocina está implicada em mau prognóstico, invasão e metástases e resistência ao tratamento com sunitinib em carcinoma de células renais (MIKAMI et al., 2015). Além disso, foi demonstrado que pequenas doses de TNF- α no microambiente tumoral podem aumentar a proliferação, invasão e metástase de células tumorais, aumentar glóbulos brancos, formar vasos sanguíneos, induzir a regulação positiva de outras citocinas e desencadear a transição epitelial-mesenquimal (EMT) das células tumorais (HO et al., 2012; TANG et al., 2017).

A compreensão mais profunda do papel crucial do sistema imune em bloquear ou sustentar a progressão do tumor levou ao desenvolvimento de várias abordagens imunoterapêuticas contra o câncer. Basicamente, o objetivo da imunoterapia do câncer é aumentar a imunidade do hospedeiro contra as células cancerígenas e, ao mesmo tempo, bloquear os elementos imunes responsáveis pela promoção da tumorigênese (CALÌ; MOLON; VIOLA, 2017).

Múltiplas formas de imunoterapia estão sendo exploradas e estas incluem: (i) abordagens de vacina para induzir respostas imuno específicas fortes a antígenos tumorais, tais como o antígeno associado a melanoma 3 (MAGE-3) e ao carcinoma de células escamosas esofágicas de New York 1 (NY-ESO-1); (ii) abordagens envolvendo a transferência adotiva de linfócitos específicos para tumores, expandidos, de surgimento natural ou geneticamente modificados *in vitro*; (iii) administração terapêutica de anticorpos monoclonais tais como rituximab (dirigido contra a proteína CD20 em células de leucemia e linfoma) e trastuzumab (dirigido contra o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2) em células de câncer da mama) para visar e eliminar células tumorais; e (iv) abordagens que inibem ou destroem os mediadores moleculares ou celulares da imunossupressão induzida por câncer, tais como o antígeno associado ao linfócito T citotóxico 4 (CTLA-4), a proteína de morte programada 1 (PD-1) ou células Treg (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011).

2.3 Estresse oxidativo no câncer

As células em seu metabolismo aeróbico são submetidas à exposição contínua a oxidantes produzidos exógena ou endogenamente (FILOMENI; ZIO; CECCONI, 2015; SIES, 2018). A homeostase da oxidação-redução (redox) é fundamental para a vida. Processos redox permeiam praticamente todos os processos fundamentais, da bioenergética ao metabolismo, e funções vitais (SIES; BERNDT; JONES, 2017).

O estresse oxidativo pode ser definido como o desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ROS/RNS) e a capacidade das células de neutralizá-las pela defesa antioxidante (PERSSON; POPESCU; CEDAZO-MINGUEZ, 2014).

ROS, também chamadas de metabólitos reativos de oxigênio (ROMs), intermediários reativos de oxigênio (ROI) e radicais oxigênio (LI; JIA; TRUSH, 2016), são subprodutos do metabolismo celular caracterizados por serem pequenas moléculas, centradas no oxigênio, contendo elétrons não-emparelhados de invólucro de valência, instáveis e altamente reativas com proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (BHATTACHARYYA et al., 2014). Estes incluem os radicais de oxigênio, como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila ($\cdot OH$), peroxila (RO_2^{\cdot}) e alcóxila (RO^{\cdot}), bem como espécies não radicais, que podem ser convertidos em radicais ou funcionar como agentes oxidantes, incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), ozônio (O_3) e oxigênio singlete (1O_2) (YANG, ZHU; XI, 2018).

Fontes de estresse oxidativo incluem os peroxissomos e enzimas, particularmente as enzimas do complexo P450, a xantina oxidase e os complexos nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidase (NADPH oxidase), que incluem a família Nox. A maioria dessas enzimas atua na mitocôndria, que é a principal fonte de estresse oxidativo. Fontes externas de estresse oxidativo incluem radiação ultravioleta, compostos químicos, a exemplo do álcool, e exercícios (SOSA et al., 2013).

Quando em quantidades baixas e moderadas ROS têm efeitos benéficos em vários processos fisiológicos, incluindo a morte de patógenos invasores, cicatrização de feridas e processos de reparo tecidual, podendo atuar também como moléculas sinalizadoras essenciais. No entanto, a geração desproporcional de ROS representa

um sério problema para a homeostase corporal e causa dano tecidual oxidativo (BHATTACHARYYA et al., 2014).

Dessa forma, os mamíferos, incluindo os humanos, desenvolveram uma série de defesas antioxidantes para proteger as biomoléculas vitais das ROS. O termo antioxidante pode ser referido a qualquer substância que possa prevenir, reduzir ou reparar o dano induzido por ROS em uma biomolécula alvo, podendo atuar (i) na eliminação direta de ROS já formados; (ii) na inibição da formação de ROS a partir de suas fontes celulares; e (iii) na remoção e reparo de danos ou modificações causadas por ROS (LI; JIA; TRUSH, 2016).

Existem vários sistemas de defesa antioxidantes para limitar os danos causados pela produção inadequada de ROS e estes incluem sistemas enzimáticos e não enzimáticos. Os primeiros incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a peroxirredoxina (Prx), a glutathione peroxidase (GPx) e a tioredoxina (Trx). Os sistemas não enzimáticos consistem principalmente de antioxidantes como a glutathione, as vitaminas C e E, a bilirrubina, o ácido úrico e o beta-caroteno. Estes sistemas de defesa antioxidante podem tornar-se sobrecarregados sob certas circunstâncias e estados de doença caracterizados por níveis persistentemente elevados de ROS (MÜNZEL et al., 2015).

O rompimento da homeostase celular normal pela sinalização redox contribui para o surgimento de diversos processos patológicos, incluindo o desenvolvimento de câncer (BHATTACHARYYA et al., 2014). Em tumores, a taxa de captação de glicose aumenta dramaticamente e o lactato é produzido, mesmo na presença de oxigênio e mitocôndrias em pleno funcionamento. Esse processo, conhecido como o *efeito Warburg* (LIBERTI; LOCASALE, 2016), causa alterações no potencial redox mitocondrial, alterando a geração de ROS (LOCASALE; CANTLEY, 2011; LIBERTI; LOCASALE, 2016).

Assim, o aumento da produção de ROS no câncer tem mostrado induzir uma variedade de efeitos biológicos, incluindo aumento da proliferação celular, danos no DNA e instabilidade genética, autofagia e também adaptações metabólicas, que contribuem para a resistência aos medicamentos e maior progressão do câncer. O resultado depende do histórico genético do câncer, dos tipos de ROS envolvidos e dos níveis e da duração da exposição às ROS (MOLONEY; COTTER, 2018).

Nesse contexto, ROS podem interferir nas diferentes etapas do processo de carcinogênese. Na etapa de iniciação do câncer, ROS atuam na promoção à mutagênese e possivelmente o estímulo à proliferação, sobrevivência e resistência ao estresse (GILL et al., 2016). No estágio de promoção, ROS aumentam a proliferação celular ou diminuem a apoptose da população celular iniciada, causando expressão gênica anormal, bloqueando a comunicação celular e modificando sistemas de segundos mensageiros (KLAUNIG et al., 1998; YANG, ZHU; XI, 2018). Para isso, ocorre modulação de vias de sinalização como a via da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK)/proteína cinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2), da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)/Akt, da proteína cinase D (PKD), proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), da via do fator nuclear κ B (NF κ B), bem como por mutações em fatores de transcrição e genes supressores de tumor, incluindo Nrf2 e p53 (MOLONEY; COTTER, 2018), que permitem a criação de cascatas de sinalização não controladas, expressão aumentada de certos genes e, portanto, proliferação celular descontrolada e formação de massas tumorais. Na fase de progressão, o aumento de ROS altera a expressão de genes supressores envolvidos na apoptose, aumenta a expressão de citocinas, do fator 1α induzido pela hipóxia (HIF- 1α) e do VEGF. Além disso, o aumento de ROS leva a uma redução na adesão intercelular e à ativação de metaloproteinases envolvidas na metástase (NOURAZARIAN et al., 2014).

Os elevados níveis de ROS nas células tumorais tornam-se compatíveis com as funções da célula tumoral (LIU; WANG, 2015) graças ao contrabalanço gerado por uma atividade aumentada de enzimas antioxidantes nas células tumorais (GALADARI et al., 2017). No entanto, aumentos adicionais nos níveis de ROS podem sobrecarregar suas capacidades antioxidantes residuais (CHIARA et al., 2012) e, desta forma, o estresse oxidativo pode causar apoptose pela indução da liberação de citocromo c da mitocôndria, pela ativação de caspases, da p53 e de cinases, incluindo a cinase 1 reguladora do sinal de apoptose (ASK1), a JNK e a p38 MAPK (UEDA et al., 2002).

Isso sugere que estratégias terapêuticas que aumentem a geração de ROS e/ou diminuam a defesa antioxidante possam induzir as células tumorais à ativação de diferentes vias de morte celular, limitando assim a progressão do câncer. De fato, uma grande variedade de agentes antineoplásicos elimina eficazmente as células tumorais ou as sensibiliza a agentes quimioterápicos por meio da modulação da

geração de ROS (GALADARI et al., 2017), a exemplo da nimustina, actinomicina D, doxorrubicina, mitomicina C, mitoxantrona, carmofur, gencitabina, mercaptopurina, camptotecina, paclitaxel, vimblastina e vinorelbina (YOKOYAMA et al., 2017).

2.4 Farmacoterapia do câncer

O tratamento do câncer consiste em cirurgia, radioterapia e terapias sistêmicas que incluem a terapia hormonal, terapia alvo, terapia imune e quimioterapia. Na fase inicial da doença, os pacientes de baixo risco são frequentemente curados apenas com cirurgia, mas em muitos outros casos é necessária uma combinação de tratamentos (FERNANDO; JONES, 2015).

Na terapia hormonal são utilizados agentes que atuam em vias bioquímicas subjacentes à função de estrogênio e androgênio para combate a tumores de mama, próstata, útero e de origem ovariana (CROMBIE; LONGO, 2016). Entre esses agentes encontram-se o tamoxifeno, modulador competitivo do receptor de estrogênio (SMITH; PREWETT, 2017) e a flutamida, modulador competitivo do receptor de androgênio (ZACHARIA, 2017).

Já a terapia alvo visa a destruição seletiva das células tumorais ao atuar em antígenos específicos ou associados ao tumor, afetando minimamente as células não tumorais (HOJJAT-FARSANGI, 2014). Esses agentes dirigidos conseguem discriminar as pequenas diferenças entre células saudáveis e cancerígenas, proporcionando terapias mais eficazes do que outros tratamentos convencionais e com menores efeitos adversos indesejáveis (BAHRAMI et al., 2017), sendo os inibidores de tirosina cinase (TKIs) e os anticorpos monoclonais (mAb) as principais classes de agentes dirigidos (FRERES; JERUSALEM; MOONEN, 2017).

Em geral, os TKIs podem bloquear múltiplas tirosina cinases envolvidas no crescimento celular (FRERES; JERUSALEM; MOONEN, 2017), a exemplo dos agentes: lapatinibe, indicado para o tratamento do câncer de mama (GRUMOLATO; AARONSON, 2015) e que atua inibindo o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e o receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER-2); pazopanibe cujo mecanismo de ação se baseia na inibição do receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) e o receptor do fator de crescimento

derivado de plaquetas (PDGFR) (RANIERI et al., 2013), sendo esse agente utilizado ,2017) e sarcomas avançados e metastáticos (DEMBLA et al., 2017); e imatinibe, um inibidor de receptores BCR-Abl cinase (MAINO et al., 2014), c-Kit, receptor de crescimento do fator derivado de plaquetas α (PDGFR α) (LINCH; CLAUS; BENSON, 2013), e c-fms (VIVIANO; ROSSI; COCCA, 2017), sendo utilizado como tratamento padrão para leucemia mieloide crônica positiva para o cromossomo Filadélfia na fase crônica e para os tumores estromais gastrointestinais (ŞEN; ÖNER; ATA, 2017).

O uso de mAb para o tratamento de tumores, permite a eliminação seletiva das células tumorais, mantendo um perfil aceitável de toxicidade (SHUPTRINE; SURANA; WEINER, 2012). Atualmente, anticorpos quiméricos, humanizados e totalmente humanos são licenciados para o tratamento do câncer (SCOTT; WOLCHOK; OLD, 2012) podendo atuar: (i) estimulando o sistema imunológico (FRERES; JERUSALEM; MOONEN, 2017), como o nivolumab que causa o bloqueio do ponto de verificação imune, por meio da inibição do receptor de morte programada-1 (PD-1), sendo aprovado para o tratamento do câncer de pulmão de células não pequenas avançado (TOKUMO et al., 2018); (ii) bloqueando sinais de crescimento e a angiogênese (FRERES; JERUSALEM; MOONEN, 2017), a exemplo do bevacizumabe, dirigido ao fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (SMITH; PREWETT, 2017) sendo utilizado no tratamento de cânceres como o de ovário (GRUNEWALD; LEDERMANN, 2017); ou (iii) aumentando a exposição das células cancerígenas à radiação e aos agentes quimioterápicos (FRERES; JERUSALEM; MOONEN, 2017), a exemplo do TDM-1, um conjugado do trastuzumab e da emetansina que demonstrou melhorar a sobrevida em pacientes com câncer de mama metastático positivo para o HER-2 (CHARLTON; SPICER et al., 2016).

A *quimioterapia* é uma das principais escolhas para o tratamento do câncer (MARTINS et al., 2016), estando disponíveis diversos agentes quimioterápicos (ANSARIZADEH; SINGH; RICHARDS, 2017) que são utilizados de acordo com a histopatologia do tumor e do tecido de origem (SHIELDS, 2017).

Essas drogas podem ser citotóxicas ou citostáticas (ANSARIZADEH; SINGH; RICHARDS, 2017) sendo classificadas pelos seus efeitos no ciclo celular ou pelas suas propriedades bioquímicas, incluindo: os agentes alquilantes, como a ciclofosfamida e os compostos de coordenação de platina, que prejudicam a função celular por meio da formação de ligações covalentes com proteínas, DNA e RNA; os

antimetabólitos, cujos mecanismos de ação se baseiam na substituição do metabólito que normalmente é incorporado ao DNA ou RNA ou na competição pelo sítio catalítico de uma enzima chave, a exemplo do metotrexato e do 5-fluoruracil (5-FU) (FERNANDO; JONES, 2015); e os produtos naturais como a vimblastina e o paclitaxel, que atuam bloqueando a mitose por ligarem-se aos microtúbulos (KATZ; BALTZ, 2016).

Apesar da quimioterapia antineoplásica ser direcionada às células tumorais (RAJI, 2005; GEORGAKOPOULOU; STEBBING; SCULLY, 2018), células saudáveis que possuem alta taxa de proliferação também são afetadas, como as células capilares, do trato gastrointestinal e da medula óssea (SMITH; PREWETT, 2017). Isso ocorre porque os agentes utilizados na quimioterapia convencional não distinguem as células saudáveis das neoplásicas (ANSARIZADEH; SINGH; RICHARDS, 2017), acarretando em efeitos colaterais indesejáveis como alopecia, mielossupressão, anemia, linfomas e leucemia (SHARMA et al., 2015), o que reflete o alto nível de toxicidade associado a tais tratamentos (FEITELSON et al., 2015).

Além dos graves efeitos tóxicos, o desenvolvimento de resistência dos tumores aos fármacos pode surgir com a quimioterapia convencional (SEVKO et al., 2013). Esse importante fenômeno clínico pode ocorrer através de vários mecanismos como a diminuição da absorção, diminuição da ativação ou aumento do efluxo do fármaco, alteração da proteína alvo, aumento do reparo do DNA, inibição da apoptose e aumento do metabolismo do fármaco (FERNANDO; JONES, 2015).

Tendo em vista esse cenário, mostra-se essencial a pesquisa por novos fármacos com atividade antitumoral que tenham maior eficácia e/ou baixa toxicidade, de forma a contribuir para o desenvolvimento de medicamentos mais efetivos e com maior tolerância para o tratamento do câncer.

2.5 O modelo de peixe-zebra (*Danio rerio*) e os estudos de toxicidade

A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos em causar danos à saúde humana (CHAPMAN et al., 2010). Diversos organismos modelos são utilizados para tal finalidade, tais como *Artemia salina* (CANSIAN et al., 2017; WANG et al., 2017), ratos (RODRIGUES-

JUNIOR et al., 2017; WEN et al., 2017), camundongos (BARROS et al., 2018; YAQUB et al., 2018) e *Danio rerio* (ZHANG et al., 2017; DAMALAS et al., 2018).

Um organismo modelo deve oferecer vantagens técnicas e práticas para o estudo dos principais processos, efeitos e mecanismos biológicos. Além disso, ele precisa ter características que possam ser generalizadas, ou seja, deve ser representativo para um grupo maior de organismos. Ambos os argumentos se tornam realidade para *Danio rerio*, uma espécie conveniente e econômica de um ponto de vista técnico e metodológico e que permite a compreensão de muitos aspectos da biologia dos vertebrados, genética, doenças e toxicologia (SEGNER, 2009).

Comumente conhecido como peixe-zebra, *Danio rerio* é um pequeno peixe de água doce tropical que vive nas bacias hidrográficas da Índia, do norte do Paquistão, do Nepal, do Butão e do sul da Ásia (BRUNDO; SALVAGGIO, 2018).

O uso desse modelo animal tem se popularizado, tanto durante os estágios adultos quanto os embrionários (CHAKRABORTY et al., 2016), sendo usado na ecologia (HALE et al., 2019; SPOSITO et al., 2018; ZHOU et al., 2018), na genética (LABOISSONNIERE et al., 2018; OJEHOMON et al., 2018), na farmacologia (BATISTA et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2018; SAMPAIO et al., 2018), no desenvolvimento de modelos de doenças como as neurodegenerativas (DOĞANLI; OXVIGC, LYKKE-HARTMANN, 2013; SARATH et al., 2016; KOEHLER, WILLIAMS, 2018;), a obesidade (HU et al., 2017; HUGO; SCHLEGEL, 2017; LANDGRAF et al., 2017) e o câncer (HILL et al., 2018; CALLAHAN et al., 2018) e nos estudos de toxicidade (SANCHES et al., 2017; FERNANDES et al., 2018; SILVA et al., 2018).

Tal popularidade ocorre devido a um conjunto excepcional de características que possui (CHAKRABORTY et al., 2016), tais como: (i) capacidade de gerar significativas quantidades de ovos, variando entre 200 a 300 por peixe, o que garante um pronto fornecimento de animais para trabalhos de pesquisa; (ii) fertilização externa e seu padrão de desenvolvimento, que facilita a observação e a manipulação experimental dos embriões (SALEEM; KANNAN, 2018); (iii) similaridade genética e fisiológica da espécie aos mamíferos, incluindo entre 70 e 80% de analogia com humanos; e (iv) baixo custo e fácil manuseio e manutenção, em comparação a outros modelos animais, como roedores (NASCIMENTO et al., 2018).

Os embriões se desenvolvem rapidamente: a gastrulação se completa em dez horas após a fertilização e o coração começa a bater no final do primeiro dia de vida

do embrião. A maioria dos órgãos é formada e funciona nos primeiros cinco dias de desenvolvimento (BEIS; STAINIER, 2006).

O óvulo recém-fertilizado está no período de zigoto até que ocorra a primeira clivagem, cerca de 40 minutos após a fertilização. O zigoto tem cerca de 0,7 mm de diâmetro no momento da fertilização. Após 24 horas de fertilização, o embrião encontra-se em estágio filotípico. O eixo do corpo se endireita desde a sua curvatura inicial em torno do saco vitelino. Inicia-se o desenvolvimento da circulação, pigmentação e barbatanas. A conclusão da morfogênese rápida de sistemas de órgãos primários, o desenvolvimento de cartilagem na cabeça e no peitoral e a eclosão ocorre de forma assíncrona em 48 horas após a fertilização. Posteriormente, 72 horas após a fertilização, a bexiga de natação infla e os comportamentos de busca por alimentos e esquiva tornam-se ativos (KIMMEL et al, 1995).

Por permanecerem transparente desde a fertilização até quando os tecidos se tornam densos e a pigmentação é iniciada (em aproximadamente 30 a 72 horas após a fertilização), os ovos de peixe-zebra permitem observações desobstruídas das principais alterações morfológicas decorrentes de efeitos tóxicos de amostras testadas. Portanto, usando pouca ampliação, os efeitos adversos da exposição química no desenvolvimento do cérebro, notocorda, coração, mandíbula, segmentação de tronco e medidas de tamanho podem ser avaliados quantitativamente (BRUNDO; SALVAGGIO, 2018).

Ensaio toxicológicos usando esse modelo incluem a avaliação da letalidade e teratogenicidade após a exposição a produtos químicos durante os primeiros dias após a fertilização. Defeitos morfológicos, como edema e comprimento/curvatura corporal alterados, frequência cardíaca e locomoção, são parâmetros toxicológicos comuns para testes de compostos (LANTZ-MCPEAK et al., 2014).

2.6 O modelo experimental de carcinoma ascítico de Ehrlich

O transplante de tumores para roedores é uma ferramenta muito útil na pesquisa experimental de câncer (ISSA et al., 2015), sendo o carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE) um dos tumorais experimentais mais comuns (OZASLAN et al., 2011).

O carcinoma de Ehrlich, adenocarcinoma mamário de camundongos, é um carcinoma indiferenciado com alta capacidade de transplante, sem regressão, sem

antígeno de transplante específico, rápida proliferação, menor tempo de vida (ISSA et al., 2015) com um comportamento muito agressivo (KABEER et al., 2019) e que, ainda, se assemelha aos tumores humanos mais sensíveis à quimioterapia (MEHMET et al., 2011), o que pode justificar o seu largo uso na pesquisa por agentes quimioterápicos (JAGANATHAN et al., 2010; ELSHERBINYA; AL-GAYYAR, 2016).

O tumor de Ehrlich pode ser usado sob duas formas: sólida ou ascítica (BEYDOGAN; BOLKENT, 2015). Quando as células tumorais são inoculadas por via intraperitoneal o tumor cresce na sua forma ascítica e, quando inoculado subcutaneamente, este cresce na forma sólida (GÜMÜŞHAN; MUSA, 2008).

A forma ascítica tem sido frequentemente preferida em pesquisas. A razão para isso é que o líquido ascítico possui uma suspensão homogênea de células tumorais que permite precisão quantitativa no transplante das células para outro camundongo (KLEIN, 1951; OZASLAN et al., 2011) além de permitir a determinação do tamanho do tumor por sistemas básicos de contagem (OZASLAN et al., 2011).

O líquido ascítico típico do CAE tem coloração cinza-claro, algumas vezes apresenta certa viscosidade. Contém cerca de 10 milhões de células neoplásicas em cada 0,1 mL. Observa-se que de 4 a 7 dias após o transplante há formação de aproximadamente 10 mL de líquido ascítico. A replicação celular se dá em duas fases: a primeira de proliferação, na qual há um crescimento exponencial do número de células, seguida por um *plateau*, secundado por uma fase de quiescência, na qual o número de células permanece quase constante (BRANDÃO, 2012).

As células desse tumor são intensamente pleomórficas e anaplásicas, com relação núcleo-citoplasma elevada, núcleo com cromatina frouxa e nucléolos múltiplos e proeminentes com elevado índice mitótico e várias figuras de mitose atípicas. O estroma é constituído por fibras colágenas e delicados capilares (PORTUGAL, 2012).

As características acima descritas situam o CAE como um tumor experimental de tipificação morfológica definida, comportamento biológico previsível e facilidade de transplante. Além disso, a sua reprodutibilidade é fácil, o que permite sua utilização nos diversos centros de pesquisa do mundo de maneira comparável (GURGEL et al., 2009; PORTUGAL, 2012).

2.7 Potencial biológico da piperina e dos seus derivados

Os produtos naturais possuem enorme diversidade química e estrutural (SHEN, 2015) que os caracteriza como uma fonte praticamente ilimitada de novos compostos líderes (AMIRKIA; HEINRICH, 2015). Nessa perspectiva, as plantas medicinais comprovaram historicamente seu valor como fonte de moléculas com potencial terapêutico e, hoje em dia, ainda representam um importante reservatório para a identificação de novas drogas (ATANASOV et al., 2015).

Diversos fármacos de origem vegetal estão aprovados atualmente para o tratamento do câncer e incluem a vincristina, que atua inibindo a mitose por ligar-se aos microtúbulos, e o etoposídeo, inibidor da enzima topoisomerase II (KATZ; BALTZ, 2016).

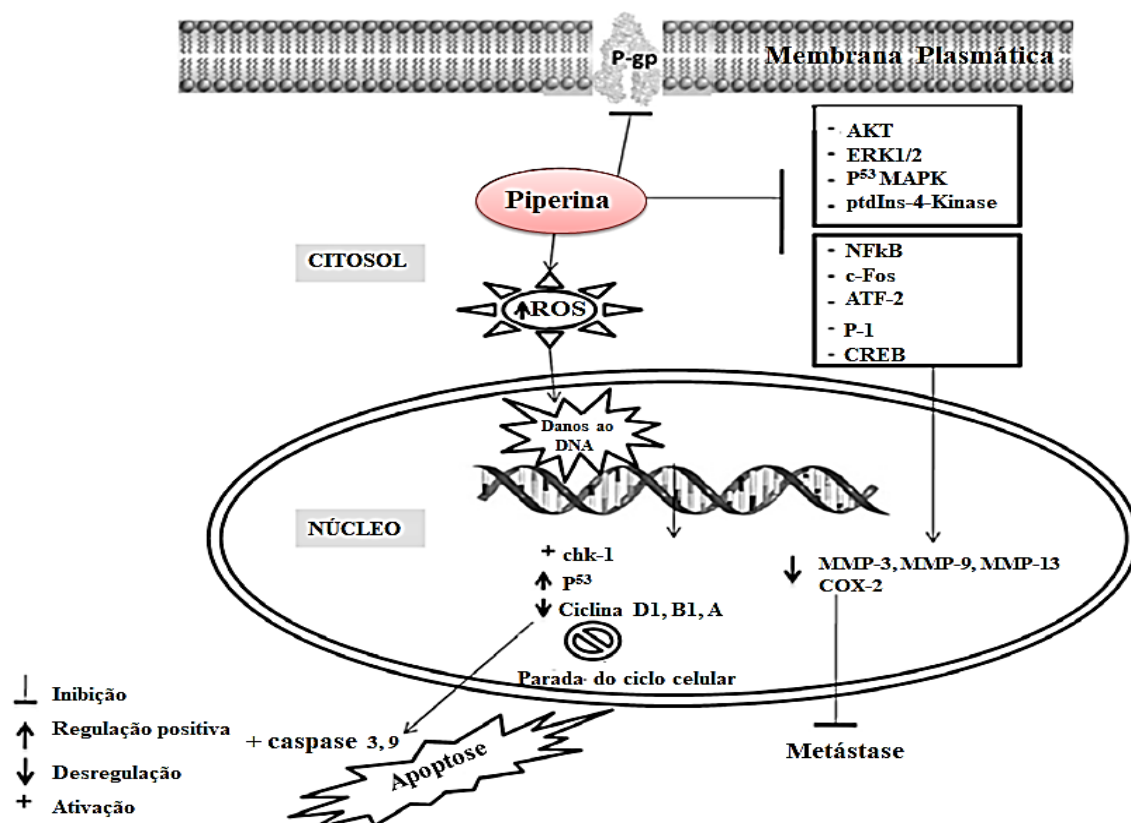
Embora progressos notáveis tenham sido feitos pela medicina, a disponibilidade de drogas antitumorais seguras e específicas continua sendo um grande desafio na prática clínica. O desenvolvimento da resistência do tumor contra os modos de tratamento disponíveis, como radioterapia e quimioterapia, juntamente com a não adesão do paciente, aumentam as demandas para a introdução de novas drogas no tratamento do câncer. Assim, encontrar uma molécula confiável para o tratamento dessa doença permanece como principal objetivo dos pesquisadores. Considerando todos esses pontos, vários compostos naturais e sintéticos têm sido estudados para o tratamento das neoplasias malignas (KUMAR et al., 2014).

A piperina, amida piperidinil do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2(E)-4(E)-pentadienoico (Figura 4A), é um alcaloide simples e pungente encontrado nas sementes da pimenta preta (*Piper nigrum*). Após seu isolamento e caracterização completa, as suas propriedades biológicas foram extensivamente estudadas e incluem atividades: antioxidante e antidislipidêmica (DHIVYA et al., 2017), anti-inflamatória (ELKADY; TAWFIK, 2018), anti-helmíntica (SIMHAM et al., 2013), anti-hiperglicêmica (MAEDA et al., 2018), larvicida (SAMUEL et al., 2016), anticonvulsivante (CHEN et al., 2013), antidepressiva (LI et al., 2007), antiparkinsoniana (SHRIVASTAVA et al., 2013), leishmanicida (FERREIRA et al., 2011), tripanocida (FREIRE-DE-LIMA et al., 2008), imunossupressora (RODGERS et al., 2016; SOUTAR et al., 2017), antidiarreica (PONGKORPSAKOL et al., 2015), antialérgica (HUANG et al., 2014), neuroprotetora (WANG-SHENG et al., 2017),

inseticida (TAVARES et al., 2011) e antitumoral (RAFIQ; GANAI; TASDUQ, 2015; ZHANG et al., 2015; GUNASEKARAN; ELANGO VAN; DEVARAJ, 2017; HAN et al., 2017; SIDDIQUI et al., 2017; SI et al., 2018; ZENG; YANG, 2018).

No que diz respeito à sua atividade antitumoral diversos mecanismos de ação são propostos: a piperina age inibindo a glicoproteína-P (P-gp), uma proteína de efluxo da membrana plasmática, que atua bombeando fármacos do interior para o exterior celular. Esse bombeamento reduz a quantidade do fármaco no citosol e, como consequência, diminui a fração do fármaco disponível para ligação ao seu alvo. Outro importante mecanismo de ação relacionado à piperina diz respeito ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), envolvidas em dano ao DNA. Como consequência desse efeito, vias pró-apoptóticas são estimuladas, a exemplo da p53, bem como, ocorre inibição de moléculas-alvo importantes para a progressão do ciclo celular, tais como as ciclinas D1, B1 e A, culminando na parada do ciclo. Tais eventos levam à ativação da apoptose e a morte da célula tumoral. Tem-se demonstrado que vias de sinalização e fatores de transcrição intrinsecamente relacionados à proliferação, progressão e sobrevivência do tumor (Akt e NF- κ B, por exemplo) são inibidos pela piperina. Tais vias estão envolvidas, por exemplo, na ativação da expressão de proteínas como as metaloproteinases de matriz (MMP) e COX-2 envolvidas no processo de metástase tumoral (CHINTA et al., 2015) (Figura 3).

Figura 3. Mecanismos de ação antitumorais da piperina.



Representação esquemática do efeito da piperina nas células tumorais.

Legenda: P-gp: glicoproteína P; ERK: cinase regulada por sinal extracelular; p38 MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno p38; PtdIns-4-kinase: fosfatidilinositol-4-cinase; NFκB: fator nuclear *kappa* B; ATF-2: fator de ativação da transcrição 2; AP-1: proteína ativadora 1; MMP-3: metaloproteinase de matriz 3; MMP-9: metaloproteinase de matriz 9; MMP-13: metaloproteinase de matriz 13; COX-2: ciclooxigenase 2; CREB: proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc; ROS: espécies reativas de oxigênio.

Fonte: Adaptado de Chinta et al., 2015.

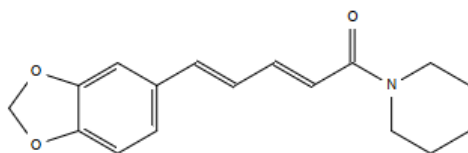
Os derivados da piperina também têm demonstrado uma gama interessante de atividades farmacológicas (CHAVARRIA et al., 2016), tais como: inibidora da survivina, uma proteína inibidora da apoptose (SATTARINEZHAD, BORDBAR, FANI, 2015), inibidora da bomba de efluxo NorA de *Staphylococcus aureus* (SANGWAN et al., 2008), inibidora da glicoproteína P (SYED et al., 2017), tripanocida (RIBEIRO et al., 2004), antiparkinsoniana (AL-BAGHDADI et al., 2012), antibacteriana (UMADEVI; DEEPTI; VENUGOPAL, 2013; VENUGOPAL; YARLA; UMADEVI, 2014; PHILIPOVA et al., 2018), antifúngica (VENUGOPAL; YARLA; UMADEVI, 2014), inseticida (PAULA

et al., 2000) e antitumoral (UMADEVI; DEEPTI; VENUGOPAL, 2013; VENUGOPAL; YARLA; UMADEVI, 2014; SANTOS et al., 2018).

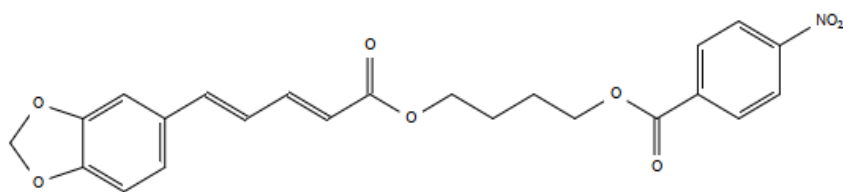
Particularmente, dois derivados da piperina foram estudados pela equipe do Laboratório de Oncofarmacologia do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (Oncofar/PPgPNSB), nomeadamente o 2-oxo-2-(4-etilfenilamina)-piperinoato de etila (HE03) e o 2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperinoato de etila (HE02). Esses derivados apresentaram baixa toxicidade aguda em camundongos Swiss fêmeas, ao considerar os valores estimados de suas DL_{50} (dose que causa a morte de 50% da população testada), aproximadas em 5.000 mg/kg, para o HE03, e 2.000 mg/kg para o HE02, via intraperitoneal (i.p.). Em adição, apresentaram significativa atividade antitumoral em carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE). O HE03 apresentou, como mecanismos de ação antitumorais, parada do ciclo celular e efeitos antiangiogênicos (SOUSA, 2015). Semelhantemente, o HE02 também induziu a parada do ciclo celular e a inibição da angiogênese. Em adição, esse derivado induziu aumento dos níveis de citocinas do perfil Th1 (IL-1 β , TNF- α , IL-12) e diminuição de citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL-10) modulando, desta forma, o sistema imune para um perfil citotóxico contra o tumor (SANTOS et al., 2018).

Desta forma, considerando que: (i) a piperina apresenta significativa toxicidade representada pela sua DL_{50} aproximada em 60 mg/kg de peso corporal, via intraperitoneal, em camundongos albinos Swiss fêmeas (PIYACHATURAWAT; GLINSUKON; TOSKULKAO, 1983); (ii) resultados promissores foram obtidos com derivados da piperina pela equipe do OncoFar (PPgPNSB/UFPB) (SOUSA, 2015; SANTOS et al., 2018); e que (iii) foi relatado anteriormente pela literatura que ésteres de ácido pipérico apresentaram considerável atividade citotóxica frente linhagens de células de carcinoma oral de células escamosas, alguns dos quais com considerável seletividade, ou seja, citotoxicidade apenas para as linhagens tumorais avaliadas, foi sintetizado um derivado inédito da piperina, o diéster 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) (Figura 4B) visando a obtenção de um nova molécula para o tratamento do câncer com maior eficácia e/ou menor toxicidade.

Figura 4. Estrutura molecular da piperina **(A)** e do 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) **(B)**.



(A)



(B)

Fonte: Própria autoria.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a toxicidade e potencial antitumoral *in vivo* do derivado da piperina 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07).

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade não clínica aguda do DE-07 em camundongos;
- Avaliar a toxicidade aguda do DE-07 em embriões/larvas de peixe-zebra;
- Avaliar a genotoxicidade do DE-07 em camundongos;
- Avaliar o potencial antitumoral *in vivo* do DE-07 em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich em camundongos;
- Investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade antitumoral *in vivo* do DE-07: efeito antiangiogênico, imunomodulador e de indução do estresse oxidativo;
- Avaliar o perfil de toxicidade do DE-07 após tratamento antitumoral em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich em camundongos.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de OncoFarmacologia (OncoFar), no biotério Prof. Thomas George, ambos do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB/Centro de Ciências da Saúde - CCS) e no Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias (LabRisco) localizado no Departamento de Biologia Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), em colaboração com o Prof. Dr. Davi Felipe Farias, todos pertencentes a Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 Material

4.2.1 Substância teste

O derivado da piperina 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) foi gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho do CCEN/UFPB.

4.2.2 Substâncias e reagentes

Foram utilizadas as seguintes substâncias: azul de tripan - (Sigma-Aldrich®, EUA); cetamina – (Cristália®, Brasil); cloridrato de xilazina – (Anasedan®, Brasil); heparina – (HEPAMAX-S®, Brasil); Solução fosfato tamponada (PBS, IpeFarM, Brasil); Tween 80 (Sigma-Aldrich®, EUA); Dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich®, EUA); 5-Fluorouracil (Sigma-Aldrich®, EUA); Kit ELISA (eBioscience®, EUA); Ciclofosfamida (Sigma-Aldrich®, EUA); coloração panótica (Newprov®, Brasil); 2',7'-diacetato diclorofluoresceína (Sigma-Aldrich®, EUA).

4.2.3 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: Centrífuga (HETTICH Zentrifugen - Rotina 380 R, Alemanha); Microscópio invertido (Olympus®, Japão); Estereomicroscópio Televal 31 (Zeiss®, Alemanha); Balança analítica (GEHAKA® AG 200, Japão); Citômetro de fluxo (FacsCanto II, EUA); Câmera fotográfica (Canon OverShot A2500, Brasil); Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se kits específicos para o analisador bioquímico automático BIO 2000 (BIOPLUS®, Brasil); e analisador hematológico celular automático Hematoclin 2.8 Vet (Bioclin/Midray®, Brasil), respectivamente.

4.2.4 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), fêmeas, pesando entre 28 e 32 g, com faixa etária aproximada de 60 dias, obtidos da Unidade de Produção Animal do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM/UFPB). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura (21 ± 1 °C), com livre acesso à comida (*pellets* de ração da marca Purina®) e água potável disponível em garrafas graduadas de polietileno, colocadas nas grades metálicas das gaiolas em sua parte superior. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de doze horas.

Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram mantidos no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento. Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB), sob a certidão nº 110/2017 (Anexo A).

Para realização dos ensaios utilizando o modelo de peixe-zebra (*Danio rerio*), foram utilizados embriões com até 3 horas pós-fertilização, fornecidos pela Unidade de Produção de Organismos Não Convencionais (UniPOM) do Departamento de Biologia Molecular (DBM/CCEN/UFPB). Os embriões foram acondicionados no Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias (LabRisco/CCEN/UFPB), que compartilha estrutura experimental com a UniPOM, de acordo com as diretrizes

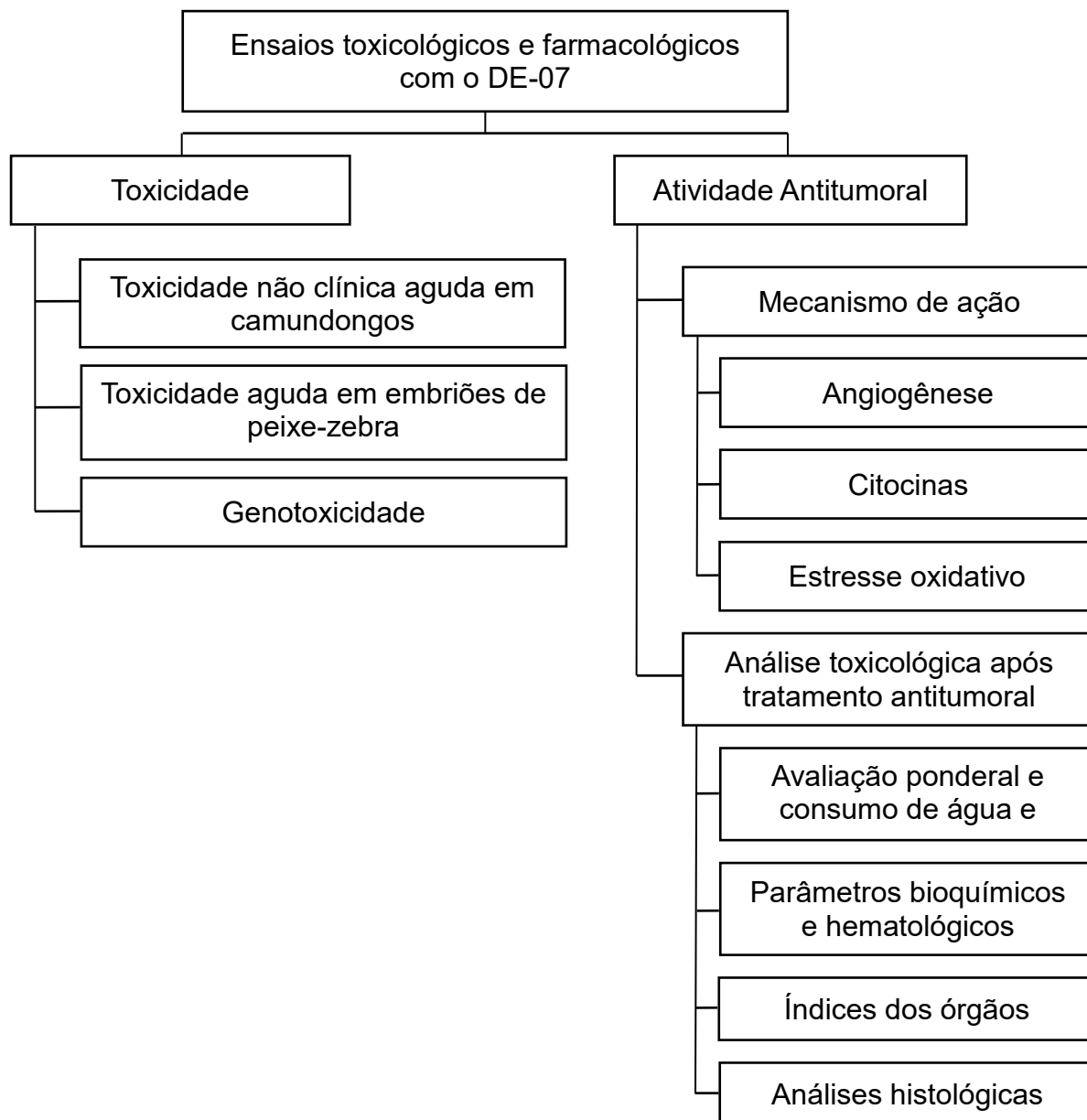
do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) até o momento dos experimentos. Peixes adultos de uma linhagem do tipo selvagem foram mantidos a 26 ± 1 °C sob ciclo claro-escuro. A qualidade da água foi mantida por filtração com carvão ativado, condutividade a 750 ± 50 μ S e oxigênio dissolvido acima de 95% de saturação. Os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial (Tropical Gran Discus, Sarandi, Brasil) e náuplios de *Artemia* sp. Para obter os embriões, uma armadilha de ovos foi colocada durante a noite em um tanque contendo espécimes masculinos e femininos (proporção de 1: 1) no dia anterior ao teste. Uma hora após o início do ciclo de luz, os ovos foram coletados com auxílio de uma pipeta de Pasteur e lavados com meio E3 (NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl₂ 0,33 mM e MgSO₄ 0,33 mM) para seleção subsequente de embriões usando um estereomicroscópio (50x ampliação). Ovos fertilizados viáveis foram selecionados para uso no teste de Toxicidade Aguda em Peixes (FET).

Larvas utilizadas no experimento ou excedentes foram acondicionadas em pequeno volume de água e conduzidos para congelamento rápido em freezer -20 °C, de acordo com o item 8.14.13 da diretriz da prática de eutanásia do CONCEA. As larvas congeladas foram conduzidas para incineração pela empresa SIM Engenharia Ambiental (Campina Grande - PB), que possui convênio para descarte de resíduos químicos e biológicos da UFPB.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pela CEUA/UFPB, sob a certidão nº 5900310718/2018 (Anexo B).

4.3 Métodos

Fluxograma 1. Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo da toxicidade e atividade antitumoral do 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07).



4.3.1 Ensaios toxicológicos

4.3.1.1 Avaliação da toxicidade não clínica aguda em camundongos

O ensaio de toxicidade aguda em camundongos foi realizado de acordo com o “Guideline for Testing of Chemicals” nº 423 da *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD), com algumas modificações (OECD, 2001) (Anexo C). Camundongos, três fêmeas por grupo, incluindo o controle, foram submetidos às doses de 300 ou 2000 mg/kg do DE-07 por via intraperitoneal (i.p.), e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (tween 80 a 12% em salina) e os animais foram observados por 14 dias. O nível de dose para ser usada como a dose de partida é selecionado a partir de um dos quatro níveis fixos, 5, 50, 300 e 2000 mg/kg. A dose inicial escolhida foi de 2000 mg/kg, pois estudos anteriores de toxicidade não clínica aguda com derivados da piperina indicaram um baixo nível de toxicidade (SOUZA, 2015; SANTOS et al, 2018). Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo preciso da DL_{50} (dose responsável pela morte de 50% dos animais experimentais), todavia fornece uma estimativa do seu valor, bem como permite uma classificação da substância em categorias de acordo com o “Globally Harmonized Classification System” - GHS.

4.3.1.2 Avaliação da toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra

A avaliação da embriotoxicidade aguda do DE-07 foi realizada em peixe-zebra de acordo com o teste FET, protocolo nº 236 da OECD (2013), com algumas modificações. Vinte poços de uma placa de microtitulação de 96 poços foram preenchidos com 300 µL/poço da amostra teste, solubilizada em DMSO 0,5%, na concentração de 100 µg/mL, outros 20 poços foram preenchidos com o mesmo volume de meio E3 (controle negativo) e outros 20 poços foram preenchidos com o mesmo volume de DMSO 0,5% (controle solvente). Em cada poço foi adicionado um embrião com até 3 horas pós-fertilização (hpf). A concentração de 100 µg/mL de DE-07 foi utilizada como teste limite de acordo com a recomendação do teste FET. Diariamente e até 96 horas após a exposição à substância teste, foram verificados os

seguintes pontos de letalidade: (i) coagulação do ovo; (ii) ausência de formação do somito; (iii) não deslocamento da base da cauda; e (iv) falta de batimentos cardíacos. Na presença de qualquer um desses pontos de letalidade o embrião/larva foi considerado morto. A exposição foi realizada em condição estática (i.e. sem renovação da substância teste ou de meio E3). As observações foram feitas utilizando um estereomicroscópio (Televal 31, Zeiss®), num aumento de 50x, e fotografadas. Ao final do experimento, as larvas sobreviventes foram rapidamente congeladas e conduzidas para incineração.

4.3.1.3 Avaliação da genotoxicidade em camundongos

Para o ensaio do micronúcleo em sangue periférico, grupos de seis camundongos Swiss fêmeas foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) com a dose de 300 mg/kg de DE-07. Um grupo controle positivo (ciclofosfamida - 50 mg/kg – i.p.) e um grupo controle negativo (Tween 80 à 12% em solução salina) foram incluídos. Após 48 horas, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.) e amostras de sangue, para confecção das extensões sanguíneas, foram coletadas pelo plexo orbital com o auxílio de uma agulha heparinizada. Após secagem, as lâminas foram coradas com coloração panótica (Newprov®) para posterior análise em microscópio óptico. Para cada animal, três extensões sanguíneas foram preparadas e um mínimo de 2000 eritrócitos contados para determinação da frequência de eritrócitos micronucleados (OECD, 1997).

4.3.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich

Células de carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE) com cinco dias de crescimento foram aspiradas da cavidade peritoneal de camundongos e implantadas por via intraperitoneal (0,5 mL - 4×10^6 células/mL) nos animais experimentais (DOLAI et al., 2012). Vinte e quatro horas após o implante, o DE-07 foi solubilizado em Tween 80 a 12% em solução salina e administrado diariamente por via intraperitoneal a grupos de

seis animais, nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg, por sete dias consecutivos. O grupo controle foi tratado com uma solução de Tween 80 a 12% em solução salina (n=6) e um quinto grupo de animais foi tratado com 5-fluorouracil (5-FU), 25 mg/kg (n=6), como droga padrão.

4.3.2.1 Volume do tumor, massa tumoral, viabilidade celular e total celular

Para a avaliação do efeito antitumoral do DE-07, um dia após a última administração do tratamento descrito no item 4.3.2, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.), e eutanasiados por deslocamento cervical. Então, o líquido ascítico foi coletado da cavidade peritoneal e o volume foi medido e expresso em mL. Uma alíquota foi retirada para a determinação da viabilidade celular pelo ensaio de exclusão do azul de tripan. Para tanto, foram incubados volumes semelhantes de líquido ascítico e de uma solução de 0,4% do corante, seguido de análise das células em câmara de Neubauer. Este ensaio avalia a habilidade de células viáveis, com membrana plasmática intacta, excluírem o corante azul de tripan, permitindo assim, a quantificação dessas células (RENZI; VALTOLINA; FORSTER, 1993). A massa do tumor foi determinada pela diferença dos pesos dos camundongos antes e depois da retirada do líquido ascítico, e foi expressa em gramas (g). A quantidade total de células viáveis no peritônio dos animais foi expressa como total celular ($\times 10^7$ células), que foi obtido como o produto do volume do tumor, expresso em mL, pela viabilidade celular, expressa como a quantidade de células $\times 10^6$ /mL.

4.3.2.2 Investigação dos mecanismos de ação antitumorais

4.3.2.2.1 Avaliação do efeito antiangiogênico

Os animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich foram tratados por sete dias com DE-07 conforme descrito no item 4.3.2. Um dia após a última administração, os animais dos grupos controle, DE-07 (50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato

de xilazina (16 mg/kg i.p.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. O peritônio foi cortado e o revestimento interior da cavidade peritoneal dos animais foi examinado e fotografado para determinação da microdensidade vascular peritumoral, com o auxílio do software AVSOFT®. A microdensidade dos vasos foi determinada pela área ocupada por vasos sanguíneos dividido pela área total selecionada (AGRAWAL et al., 2011).

4.3.2.2.2 Quantificação de citocinas no lavado peritoneal

Para a quantificação de citocinas, os animais foram divididos em grupos (n=6/grupo) para implante das células de carcinoma de Ehrlich, e tratados conforme descrito no item 4.3.2. No dia seguinte após a última administração, os animais dos grupos controle, DE-07 (50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. O líquido ascítico coletado da cavidade peritoneal dos animais foi centrifugado a 1200 rpm, por 5 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20 °C para posterior dosagem das citocinas, por meio de ELISA, de acordo com o protocolo especificado no *Kit* do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA). Brevemente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, anti-IL-1 β , anti-IL-4, anti-IL-10, anti-IL-12, anti-CCL2 e anti-TNF- α , solubilizados em tampão fosfato, e incubadas *overnight* a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS contendo tween 20 a 0,05% (PBST) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo soro fetal bovino a 10%), por uma hora. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e foram adicionadas tanto as amostras a serem analisadas, quanto diferentes concentrações das citocinas recombinantes IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-12, CCL2 e TNF- α para a obtenção da curva. As placas foram novamente incubadas *overnight* a 4 °C. Terminado o período de incubação, as placas foram lavadas e o complexo detector formado pelo anticorpo de detecção biotilado foi adicionado às placas que foram incubadas por uma hora. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e então foi adicionado o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidin-HRP). As placas foram incubadas por

mais meia hora à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e, após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1N e a leitura realizada em leitor de placa a 450 nm. A quantidade de citocinas foi calculada a partir das curvas-padrão.

4.3.2.2.3 Avaliação do estresse oxidativo: quantificação de espécies reativas de oxigênio

Foi utilizada metodologia previamente descrita (HASUI et al., 1989 adaptado) que se baseia na oxidação do reagente 2'7 – dicloro dihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Os animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich foram tratados por sete dias com DE-07 conforme descrito no item 4.3.2. No dia seguinte após a última administração, os animais dos grupos controle, DE-07 (50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. O líquido peritoneal foi lavado com PBS a 1000 rpm, 4 °C, durante 5 minutos. Após esse processo, 490 µL de células (2×10^6 células/mL), 10 µL de solução de DCFH-DA (500 µM), obtendo concentração final de 10µM de DCFH-DA, e PBS q.s.p. 1 mL foram encubados ao abrigo de luz durante 30 minutos a 37 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (3000 rpm, 4 °C, durante 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500 µL de PBS para leitura em citômetro de Fluxo (FacsCanto II, BD, EUA) em 530 nm de fluorescência e 485 nm de comprimento de excitação. A quantificação do *burst* ou espécies reativas de oxigênio (ROS) foi estimada pela intensidade média de fluorescência.

4.3.2.3 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich

4.3.2.3.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos produzidos pelo tratamento com DE-07, os animais de todos os grupos foram pesados no início e no final do tratamento e diariamente foram avaliados os consumos de água e de ração (SANTOS et al., 2018).

4.3.2.3.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos

Os animais transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich foram tratados por sete dias com DE-07 conforme descrito no item 4.3.2. No dia seguinte após a última administração, após jejum de quatro horas, os animais de todos os grupos foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.), e amostras de sangue foram coletadas pelo plexo orbital com o auxílio de uma agulha heparinizada. Para a análise dos parâmetros bioquímicos (ureia, creatinina, aspartato aminotransferase - AST e alanina aminotransferase - ALT) o sangue foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm para obtenção do plasma. Já para as análises hematológicas foi utilizado sangue total heparinizado e realizada avaliação das séries vermelha e branca (eritograma e leucograma, respectivamente). Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se *kits* específicos para o analisador bioquímico automático BIO 2000 (BIOPLUS®) e o analisador hematológico celular automático Hematoclin 2.8 Vet (Bioclin/Midray), respectivamente. As extensões sanguíneas foram coradas com coloração panótica e analisadas em microscópio óptico, para realização da contagem diferencial de leucócitos (MOURA et al., 2016).

4.3.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Após a coleta de sangue descrita no item 4.3.2.3.2, os animais de todos os grupos foram eutanasiados por deslocamento cervical, e os órgãos (timo, baço, fígado, rins e coração) foram removidos e pesados para o cálculo dos seus índices. O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula: Índice = peso do órgão (mg)/peso do animal (g) (SANTOS et al., 2018).

4.3.2.3.4 Análises histológicas

Após a pesagem dos órgãos, descrita no item 4.3.2.3.3, fígado e rins dos animais dos grupos controle, DE-07 (50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram seccionados, fixados em formalina tamponada (solução de formol a 10%) e após 24 horas foram resseccionados para processamento histológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais. Em micrótomo rotativo semi-automático, os fragmentos tissulares emblocados em parafina, foram seccionados em espessura de 3,0 μm e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina e Tricrômico de Gomori, este último destinado ao estudo do tecido hepático. Em seguida foram examinados ao microscópio óptico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). As análises histológicas foram realizadas com a colaboração da Profa. Dra. Karina Carla de Paula do Departamento de Morfologia, do Centro de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

4.3.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). Os valores obtidos da quantificação do estresse oxidativo (ensaio do DCFH-DA) foram analisados pelo teste *t Student* seguido por teste Mann Whitney U. Para os demais resultados empregou-se o teste de Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey. Os valores foram considerados significativos, quando apresentassem um nível de significância (*p*) menor que 0,05.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Ensaios toxicológicos

5.1.1 Avaliação da toxicidade não clínica aguda em camundongos

A administração de 2000 mg/kg do DE-07, na primeira etapa do ensaio de toxicidade não clínica aguda, causou a morte de dois animais experimentais. Seguindo o guia nº 423 da OECD (2001), a etapa seguinte foi a administração da dose de 300 mg/kg do DE-07 em três outros animais, não sendo observada morte (Tabela 1). Diante desse resultado e seguindo o referido guia, o passo seguinte foi a repetição da dose de 300 mg/kg, não sendo observada morte de nenhum dos animais experimentais. Desta forma, o valor de DL_{50} foi estimado em torno de 1000 mg/kg e pela classificação GHS, o DE-07 enquadrou-se na categoria 4.

Tabela 1. Mortalidade após administração de doses únicas (i.p.) do 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) em camundongos.

Grupos		Morte/Tratado
Controle		0/3
2000 mg/kg		2/3
Controle	Experimento 1	0/3
		300 mg/kg 0/3
Controle	Experimento 2	0/3
		300 mg/kg 0/3

Fonte: Própria autoria.

5.1.2 Avaliação da toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra

Como observado na tabela 2, o DE-07 não causou a morte de nenhum embrião ou larva de peixe-zebra. Os embriões e larvas (Figura 5) do peixe-zebra não apresentaram, durante o período de 96 h de observação, nenhuma alteração relacionada aos pontos de letalidade verificados ou ainda qualquer outra modificação morfológica e de desenvolvimento. Os embriões/larvas em meio E3 ou DMSO a 0,5%

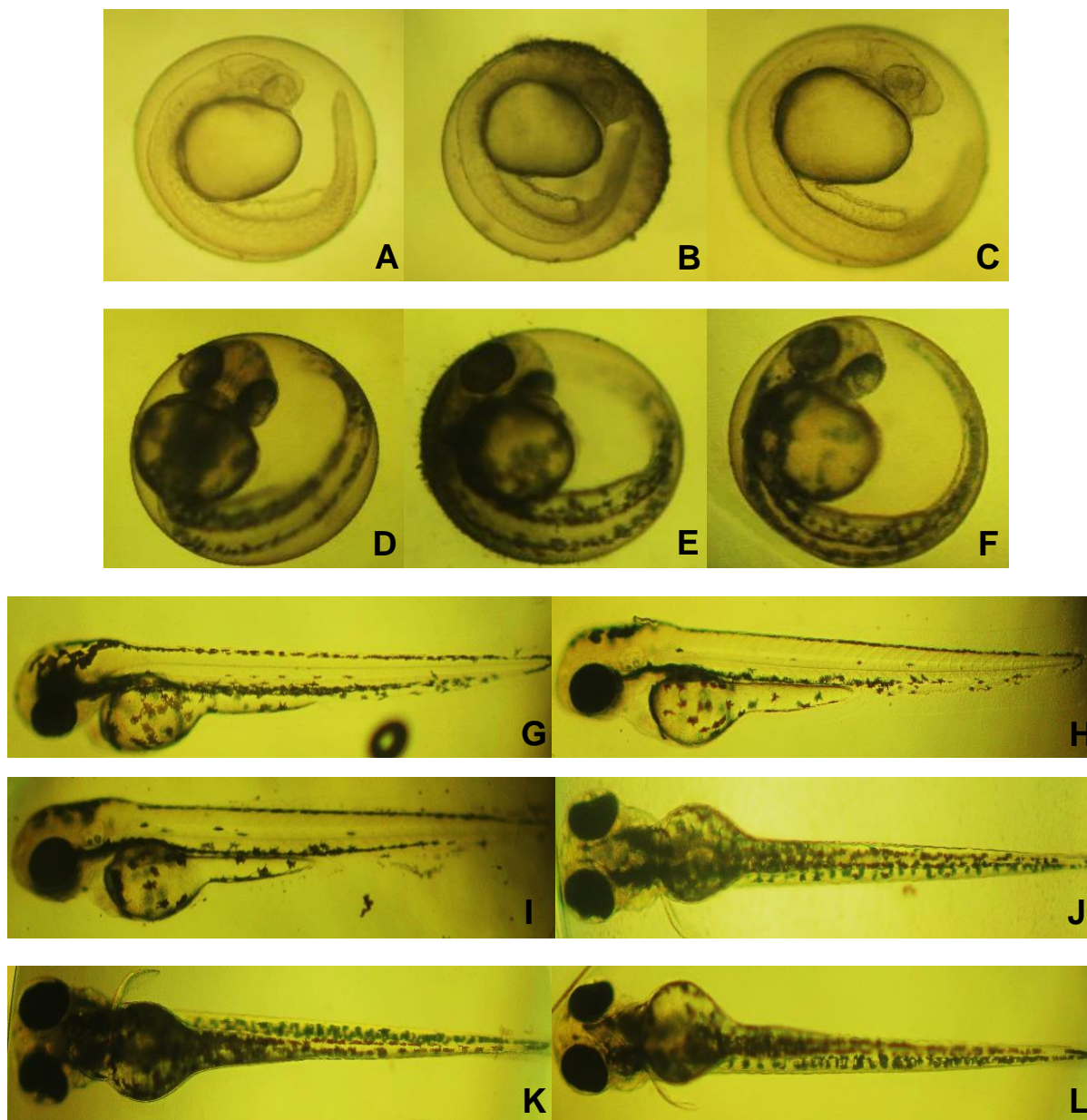
também não apresentaram nenhuma alteração no período de observação. Dado o exposto, é possível afirmar que a CL_{50} para 96 h de exposição de embriões/larvas de peixe-zebra ao DE-07 é maior que 100 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 2. Efeito da exposição do 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) e do dimetilsulfóxido (DMSO) a embriões/larvas de peixe-zebra.

Grupos	Número de mortos [†] /Número total de embriões/larvas
Controle	0/20
DE-07 (100 $\mu\text{g/mL}$)	0/20
DMSO (0,5%)	0/20

[†]O embrião/larva foi considerado morto a partir da verificação dos seguintes pontos de letalidade: (i) coagulação do ovo; (ii) ausência de formação do somito; (iii) não deslocamento da base da cauda; e (iv) falta de batimentos cardíacos, de acordo com a recomendações do teste FET nº 236 (OECD, 2013).
Fonte: Própria autoria.

Figura 5. Embriões e larvas de peixe-zebra expostos ao 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07), na concentração de 100 µg/mL, ou aos controles meio E3 e DMSO (dimetilsulfóxido) a 0,5% durante 96 h.



Imagens representativas dos embriões e larvas de peixe-zebra após exposição ao DE-07 ou DMSO 0,5%. Após 24 horas de exposição (A–C): **(A)** meio E3; **(B)** concentração de 100 µg/mL de DE-07; **(C)** DMSO a 0,5% em meio E3. Após 48 horas de exposição (D–F): **(D)** meio E3; **(E)** concentração de 100 µg/mL de DE-07; **(F)** DMSO a 0,5% em meio E3. Após 72 horas de exposição (G–I): **(G)** meio E3; **(H)** concentração de 100 µg/mL de DE-07; **(I)** DMSO a 0,5% em meio E3. Após 96 horas de exposição (J–L): **(J)** meio E3; **(K)** concentração de 100 µg/mL de DE-07; **(L)** DMSO a 0,5% em meio E3. Aumento de 50x.

Fonte: Própria autoria.

5.1.3 Avaliação da genotoxicidade em camundongos

A tabela 3 mostra o número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico após tratamento com DE-07 ou com ciclofosfamida. O tratamento com DE-07 (300 mg/kg) não induziu aumento significativo do número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico ($4,60 \pm 0,51$) quando comparado ao grupo controle ($6,00 \pm 0,57$).

Como esperado, a ciclofosfamida induziu aumento no número de eritrócitos micronucleados ($18,40 \pm 0,52$; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle.

Tabela 3. Número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) e ciclofosfamida.

Grupos	Dose (mg/kg)	Número de eritrócitos micronucleados
Controle	-	$6,00 \pm 0,57$
DE-07	300	$4,60 \pm 0,51^b$
Ciclofosfamida	50	$18,40 \pm 0,52^a$

Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo ciclofosfamida.

Fonte: Própria autoria.

5.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich

5.2.1 Volume do tumor, massa tumoral, viabilidade celular e total celular

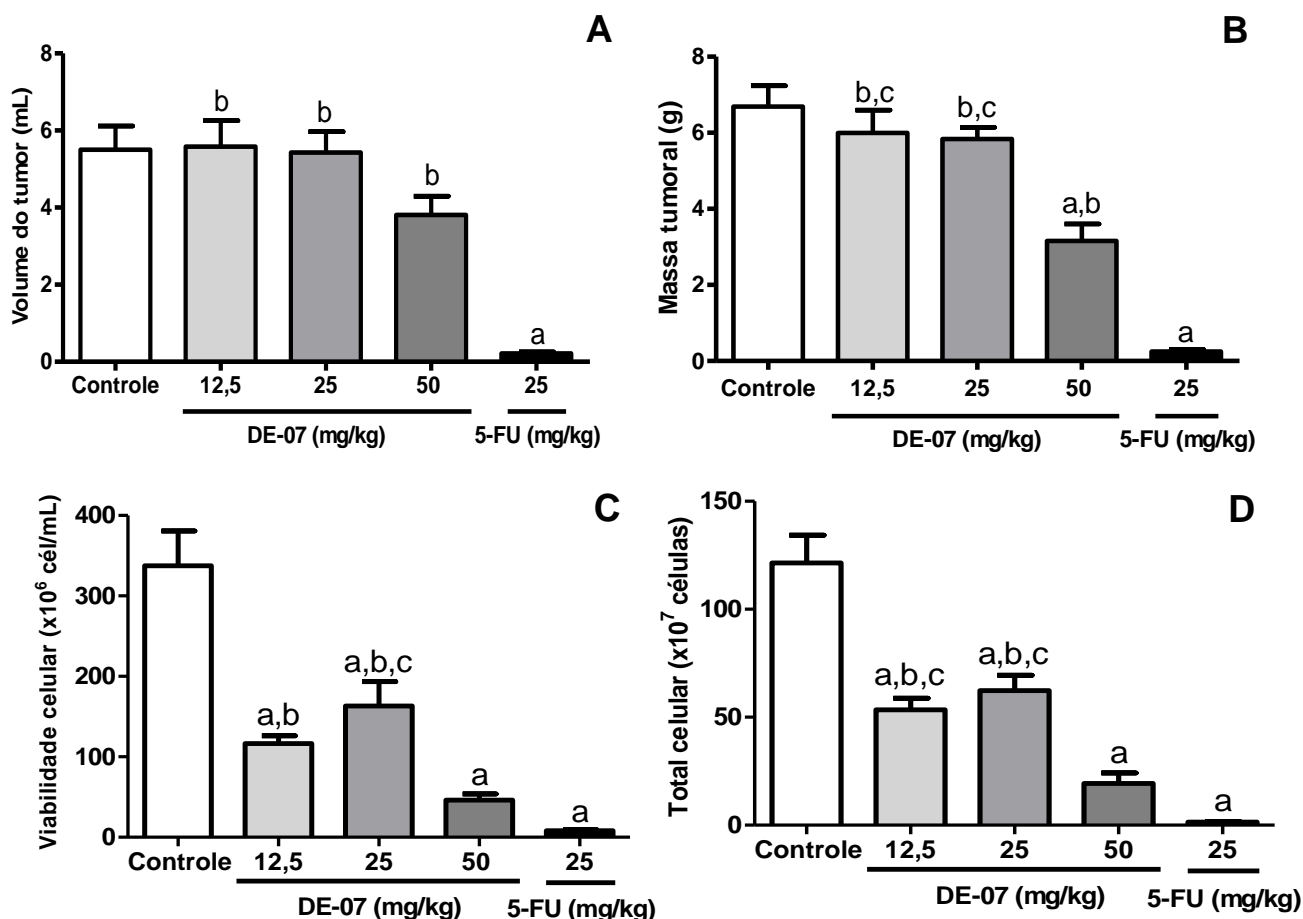
O tratamento com DE-07 durante sete dias não induziu alterações significativas no volume tumoral (Gráfico 1A) em nenhuma das doses testadas, quando comparado ao grupo controle. Contudo, observou-se redução significativa da massa tumoral do grupo tratado com DE-07 na dose de 50 mg/kg ($3,15 \pm 0,45$ g; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($6,69 \pm 0,54$ g) (Gráfico 1B).

Pode-se observar que DE-07 reduziu significativamente a viabilidade celular nas doses de 12,5 mg/kg ($116,60 \pm 9,40 \times 10^6$ células/mL; $p < 0,05$), 25 mg/kg ($163,20 \pm 30,32 \times 10^6$ células/mL; $p < 0,05$) e 50 mg/kg ($46,24 \pm 7,71 \times 10^6$ células/mL; $p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle ($337,40 \pm 43,37 \times 10^6$ células/mL) (Gráfico 1C).

Ao considerar o parâmetro total celular, o tratamento com DE-07 também induziu redução significativa nas três doses avaliadas (Gráfico 1D) (12,5 mg/kg: $53,39 \pm 5,41 \times 10^7$ células, $p < 0,05$; 25 mg/kg: $62,36 \pm 7,05 \times 10^7$ células, $p < 0,05$; e 50 mg/kg: $22,26 \pm 3,11 \times 10^7$ células, $p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($121,50 \pm 12,81 \times 10^7$ células).

O tratamento com o 5-FU (25 mg/kg) reduziu significativamente todos os parâmetros avaliados (volume tumoral: $0,22 \pm 0,04$ mL; $p < 0,05$; peso tumoral: $0,25 \pm 0,05$ g; $p < 0,05$; viabilidade celular: $8,00 \pm 1,43 \times 10^6$ células/mL; $p < 0,05$; e total celular: $1,41 \pm 0,30 \times 10^7$ células; $p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle.

Gráfico 1 - Efeito do tratamento com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) e 5-fluorouracil (5-FU) em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.



A: Volume Tumoral. **B:** Massa tumoral. **C:** Viabilidade celular. **D:** Total celular. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com 5-FU; ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com DE-07 (50 mg/kg).

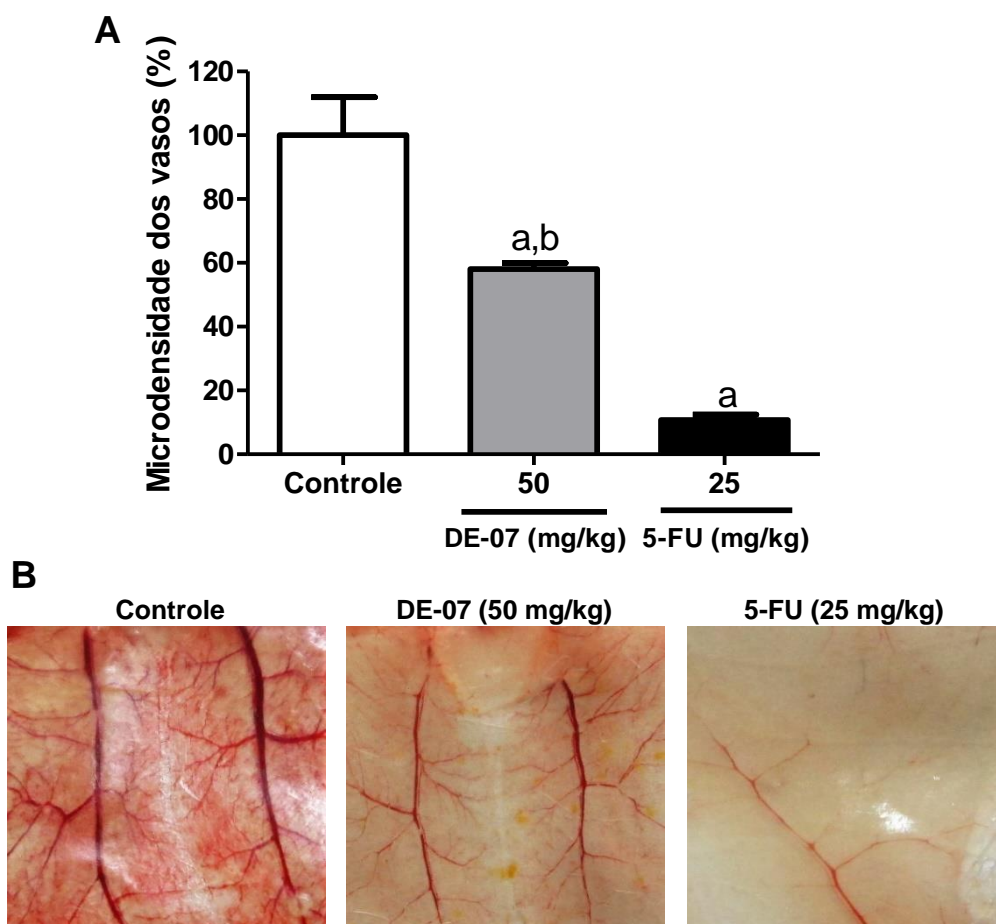
Fonte: Própria autoria.

5.2.2 Investigação dos mecanismos de ação antitumorais

5.2.2.1 Avaliação do efeito antiangiogênico

O tratamento com DE-07 reduziu significativamente a microdensidade vascular tumoral ($58,10\% \pm 1,85$; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($100,00\% \pm 11,99$), o que também foi observado no grupo tratado com a droga padrão 5-FU ($10,70\% \pm 1,70$; $p < 0,05$) (Figura 6).

Figura 6. Efeito do tratamento com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) e 5-fluorouracil (5-FU) na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.



A: A microdensidade vascular (%) foi determinada pela área ocupada por vasos sanguíneos dividido pela área total selecionada. As figuras foram cortadas em tamanho padrão (1 cm x 1 cm). **B:** Imagens representativas da inibição da angiogênese peritoneal após tratamento com DE-07 e 5-FU. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais analisados por ANOVA seguido por Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao controle; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU.

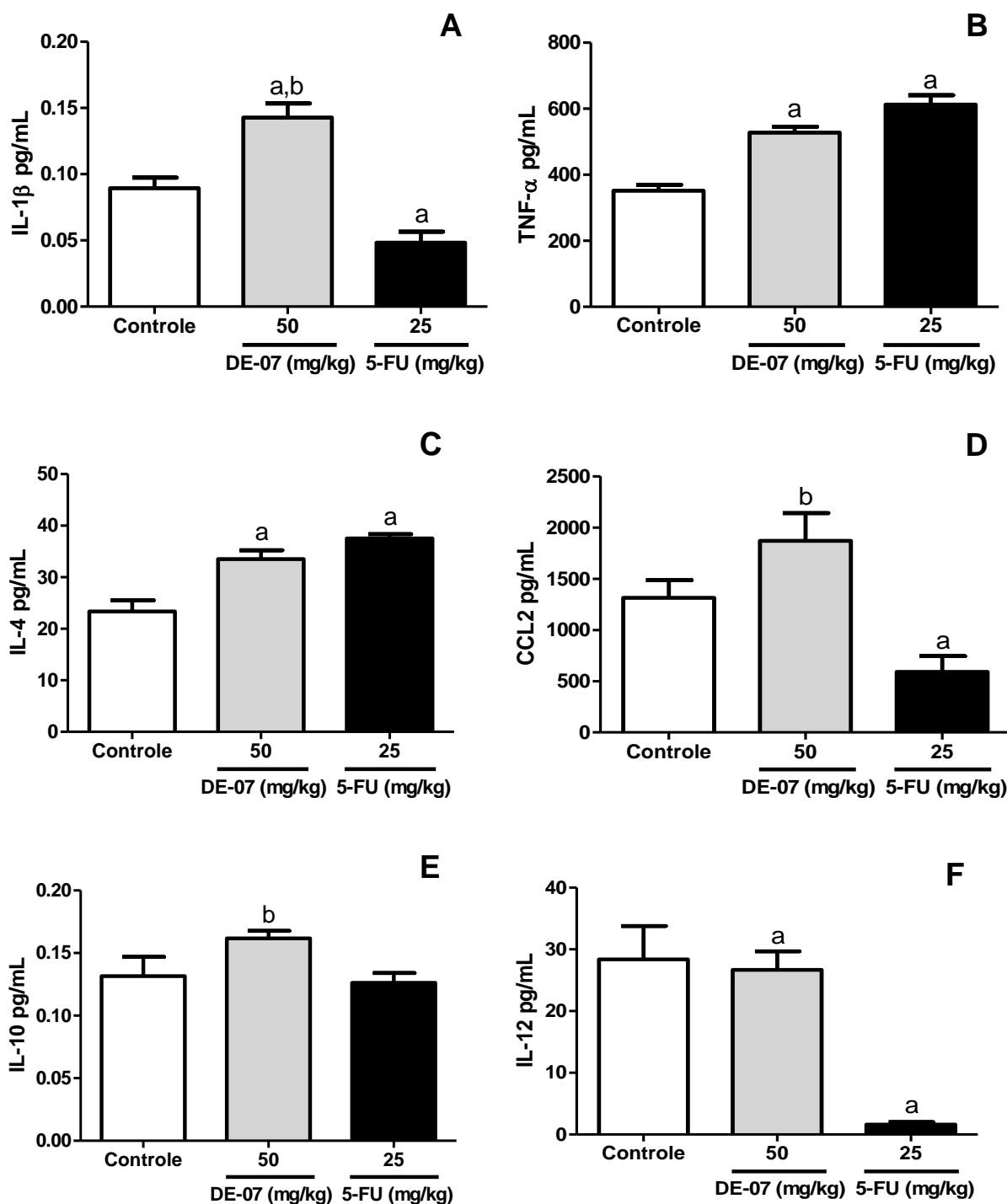
Fonte: Própria autoria.

5.2.2.2 Quantificação de citocinas no lavado peritoneal

Pode-se observar aumento significativo da concentração da IL-1 β no lavado peritoneal dos animais do grupo tratado com DE-07 ($0,14 \pm 0,01$ pg/mL; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($0,10 \pm 0,01$ pg/mL). De maneira oposta, o grupo tratado com a droga padrão 5-FU, apresentou redução significativa da concentração dessa citocina ($0,05 \pm 0,01$ pg/mL; $p < 0,05$) (Gráfico 2A). Em relação ao TNF- α e à IL-4, é possível observar que houveram aumentos significativos nas concentrações dessas citocinas nos grupos tratados com DE-07 ($527,80 \pm 17,72$, $p < 0,05$; $33,50 \pm 1,74$ pg/mL, $p < 0,05$, respectivamente) e 5-FU ($612,10 \pm 29,04$; $37,54 \pm 0,83$ pg/mL, respectivamente; $p < 0,05$ para ambos), quando comparados ao grupo controle ($351,40 \pm 18,32$; $23,36 \pm 2,14$ pg/mL, respectivamente) (Gráfico 2B e 2C).

No entanto, o tratamento com DE-07 não induziu nenhuma alteração significativa na concentração da CCL2 ($1869,00 \pm 271,20$ pg/mL), quando comparado ao grupo controle ($1313,00 \pm 173,70$ pg/mL). O grupo tratado com o 5-FU apresentou redução significativa da concentração dessa citocina ($590,00 \pm 101,60$ pg/mL; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle (Gráfico 2D). Da mesma forma, DE-07 não causou alteração significativa na produção da IL-10 ($0,16 \pm 0,01$ pg/mL) e IL-12 ($26,69 \pm 3,00$ pg/mL), em relação ao grupo controle ($0,13 \pm 0,02$; $28,39 \pm 5,40$ pg/mL, respectivamente). O tratamento com o 5-FU não induziu alteração significativa na concentração da IL-10 ($0,12 \pm 0,01$ pg/mL) em relação ao grupo controle (Gráfico 2E). Em adição, o tratamento com a droga padrão causou redução significativa da IL-12 ($1,61 \pm 0,27$ pg/mL; $p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Gráfico 2F).

Gráfico 2. Concentração de citocinas no lavado peritoneal de camundongos transplantados com CAE submetidos ao tratamento com o 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) e 5-fluorouracil (5-FU).



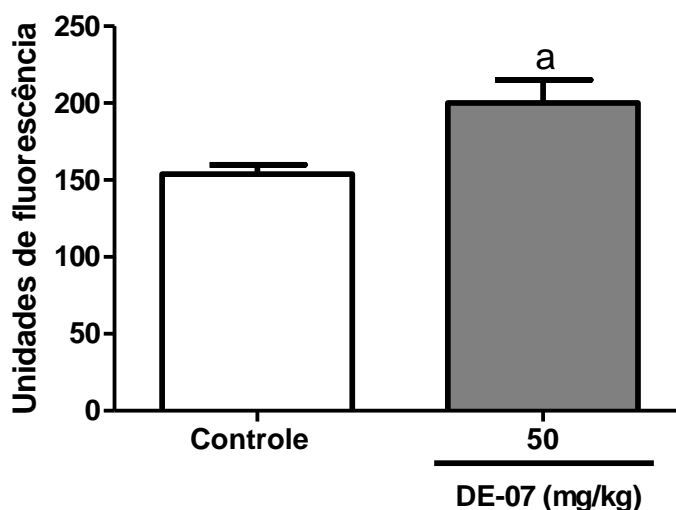
A: IL-1 β . **B:** TNF- α . **C:** IL-4. **D:** CCL2. **E:** IL-10. **F:** IL-12. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com 5-FU.

Fonte: Própria autoria.

5.2.2.3 Avaliação do estresse oxidativo: quantificação de espécies reativas de oxigênio

O tratamento com DE-07 induziu aumento significativo da produção de espécies reativas de oxigênio ($200,00 \pm 15,06$ unidades de fluorescência; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($153,80 \pm 153,80$ unidades de fluorescência) (Gráfico 3).

Gráfico 3. Produção de espécies reativas de oxigênio após tratamento 4-(4-nitrobenzoato)-piperinato de butila (DE-07).



Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais analisados pelo teste *t* Student seguido por Teste Mann Whitney U. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Fonte: Própria autoria.

5.2.3 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich

5.2.3.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e ração

Na tabela 4 estão expressos os valores dos consumos de água e ração, bem como dos pesos iniciais e finais dos animais após sete dias de tratamento com DE-07.

Conforme evidenciado, houve redução significativa nos consumos de água e ração dos animais tratados com DE-07 ($18,00 \pm 2,50$ mL; $p < 0,05$; $15,50 \pm 1,48$ g; $p < 0,05$, respectivamente), quando comparado ao grupo controle ($38,00 \pm 4,00$ mL; $28,25 \pm 5,36$ g, respectivamente), não sendo observadas alterações significativas nos pesos inicial e final dos animais quando comparados ao grupo controle.

Tabela 4. Consumo de água e ração, e evolução ponderal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich submetidos ao tratamento com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) e 5-fluorouracil (5-FU).

Grupos	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	$38,00 \pm 4,00$	$28,25 \pm 5,36$	$32,20 \pm 0,31$	$28,08 \pm 0,85$
DE-07	$18,00 \pm 2,50^a$	$15,50 \pm 1,48^a$	$30,88 \pm 0,55$	$27,00 \pm 1,11$
5-FU	$29,00 \pm 2,96$	$21,80 \pm 1,51$	$30,67 \pm 1,00$	$28,67 \pm 0,33$

Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Fonte: Própria autoria.

5.2.3.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos

Na tabela 5 estão expressos os valores dos parâmetros hematológicos de sangue periférico dos animais após sete dias de tratamento com DE-07 ou 5-FU. Os dados do eritrograma permitem a observação de que houve aumento significativo do hematócrito dos animais tratados com DE-07 ($42,33 \pm 2,70\%$; $p < 0,05$), em comparação ao grupo controle ($29,13 \pm 2,00\%$). Em adição, o DE-07 não causou alterações significativas dos demais parâmetros do eritrograma, quando comparado ao controle.

Em relação ao leucograma, o tratamento com DE-07 induziu aumento significativo da contagem total de leucócitos ($19,17 \pm 1,13 \times 10^3/\text{mm}^3$; $p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($8,00 \pm 0,94 \times 10^3/\text{mm}^3$).

Ainda, observa-se redução significativa do percentual dos linfócitos dos animais tratados com DE-07 ($64,50 \pm 2,08\%$; $p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($73,00 \pm 2,32\%$).

O tratamento com o 5-FU causou aumento significativo no CHCM ($37,12 \pm 2,61$ g/dL; $p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($29,11 \pm 0,21$ g/dL). No leucograma,

reduções significativas da contagem de leucócitos totais e dos percentuais de segmentados e monócitos ($3,48 \pm 0,27 \text{ } 10^3/\text{mm}^3$; $9,40 \pm 0,87\%$; $1,25 \pm 0,25\%$, respectivamente, $p < 0,05$ para todos) foram observadas no grupo tratado com a droga padrão, quando comparado ao grupo controle ($8,00 \pm 0,94 \text{ } 10^3/\text{mm}^3$; $19,38 \pm 2,11\%$; $5,50 \pm 0,63\%$, respectivamente). Ainda, o tratamento com 5-FU causou aumento significativo no percentual de linfócitos ($88,00 \pm 1,10\%$; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle.

Tabela 5. Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich submetidos aos tratamentos com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) e 5-fluorouracil (5-FU).

Parâmetro	Parâmetros normais [†]	Controle	DE-07 (50 mg/kg)	5-FU (25 mg/kg)
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	9,00 – 11,50	$5,36 \pm 0,57$	$7,40 \pm 0,40$	$5,78 \pm 0,65$
Hemoglobina (g/dL)	14,50 – 17,50	$11,78 \pm 0,85$	$15,10 \pm 0,64$	$12,64 \pm 1,30$
Hematócrito (%)	45,00 – 57,00	$29,13 \pm 2,00$	$42,33 \pm 2,70^a$	$36,60 \pm 4,00$
VCM (fm^3)	45,00 – 55,00	$56,61 \pm 3,65$	$57,35 \pm 2,32$	$63,68 \pm 2,52$
HCM (pg)	13,00 – 16,00	$22,68 \pm 1,00$	$20,50 \pm 0,24$	$21,98 \pm 0,40$
CHCM (g/dL)	29,00 – 34,00	$29,11 \pm 0,21$	$35,55 \pm 1,50$	$37,12 \pm 2,61^a$
Leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$)	1,00 – 12,00	$8,00 \pm 0,94$	$19,17 \pm 1,13^{a,b}$	$3,48 \pm 0,27^a$
Linfócitos (%)	60 – 90	$73,00 \pm 2,32$	$64,50 \pm 2,08^{a,b}$	$88,00 \pm 1,10^a$
Segmentados (%)	10 – 40	$19,38 \pm 2,11$	$26,33 \pm 2,23^b$	$9,40 \pm 0,87^a$
Monócitos (%)	0 – 6	$5,50 \pm 0,63$	$6,00 \pm 0,40^b$	$1,25 \pm 0,25^a$
Eosinófilos (%)	0 – 5	$2,00 \pm 0,26$	$2,83 \pm 0,50$	$2,00 \pm 0,31$

Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. [†]Parâmetros hematológicos normais segundo GAD (2007); ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com 5-FU.

Fonte: Própria autoria.

No que diz respeito aos parâmetros bioquímicos, o DE-07 causou redução de AST ($115,90 \pm 9,02 \text{ U/L}$; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($165,90 \pm 8,81 \text{ U/L}$). O tratamento com o 5-FU causou aumento significativo da concentração de

creatinina ($0,82 \pm 0,07$ mg/dL; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($0,18 \pm 0,03$ mg/dL; $p < 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) e 5-fluorouracil (5-FU).

Grupos	Dose (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Parâmetros normais [†]	-	25,00 – 100,00	70,00 – 400,00	15,00 – 40,00	0,20 – 0,60
Controle	-	$170,10 \pm 7,26$	$165,90 \pm 8,81$	$40,26 \pm 0,82$	$0,18 \pm 0,03$
DE-07	50	$178,10 \pm 17,63$	$115,90 \pm 9,02^{a,b}$	$49,91 \pm 4,00$	$0,27 \pm 0,40^b$
5-FU	25	$176,00 \pm 3,34$	$162,60 \pm 2,30$	$39,75 \pm 2,50$	$0,82 \pm 0,07^a$

Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. [†]Parâmetros bioquímicos normais segundo GAD (2007); ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com 5-FU.

Fonte: Própria autoria.

5.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos

O DE-07 não causou alteração significativa, em relação ao grupo controle, em nenhum dos índices dos órgãos avaliados. Aumentos significativos dos índices do coração, fígado e rins foram observadas nos animais tratados com 5-FU ($4,32 \pm 0,33$; $63,86 \pm 1,30$; e $11,20 \pm 0,37$ mg/g, respectivamente; $p < 0,05$ para todos) em comparação aos do grupo controle ($3,30 \pm 0,20$; $54,03 \pm 1,43$; e $9,40 \pm 0,30$ mg/g, respectivamente) (Tabela 7).

Tabela 7. Índices dos órgãos de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich submetidos ao tratamento com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) e 5-fluorouracil (5-FU).

Grupos	Índice de coração (mg/g)	Índice de timo (mg/g)	Índice de baço (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)
Controle	3,30 ± 0,20	2,71 ± 0,30	4,44 ± 0,60	54,03 ± 1,43	9,40 ± 0,30
DE-07	2,73 ± 0,10 ^b	1,81 ± 0,30	4,33 ± 0,59	53,40 ± 3,30 ^b	9,00 ± 0,10 ^b
5-FU	4,32 ± 0,33 ^a	2,30 ± 0,20	4,00 ± 0,14	63,86 ± 1,30 ^a	11,20 ± 0,37 ^a

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com 5-FU.

Fonte: Própria autoria.

5.2.3.4 Análises histológicas

Para uma avaliação mais detalhada dos possíveis efeitos nefrotóxicos e hepatotóxicos dos animais tratados com DE-07 (50 mg/kg), análises histopatológicas em hematoxilina e eosina (HE) e tricrômico de Gomori foram realizadas.

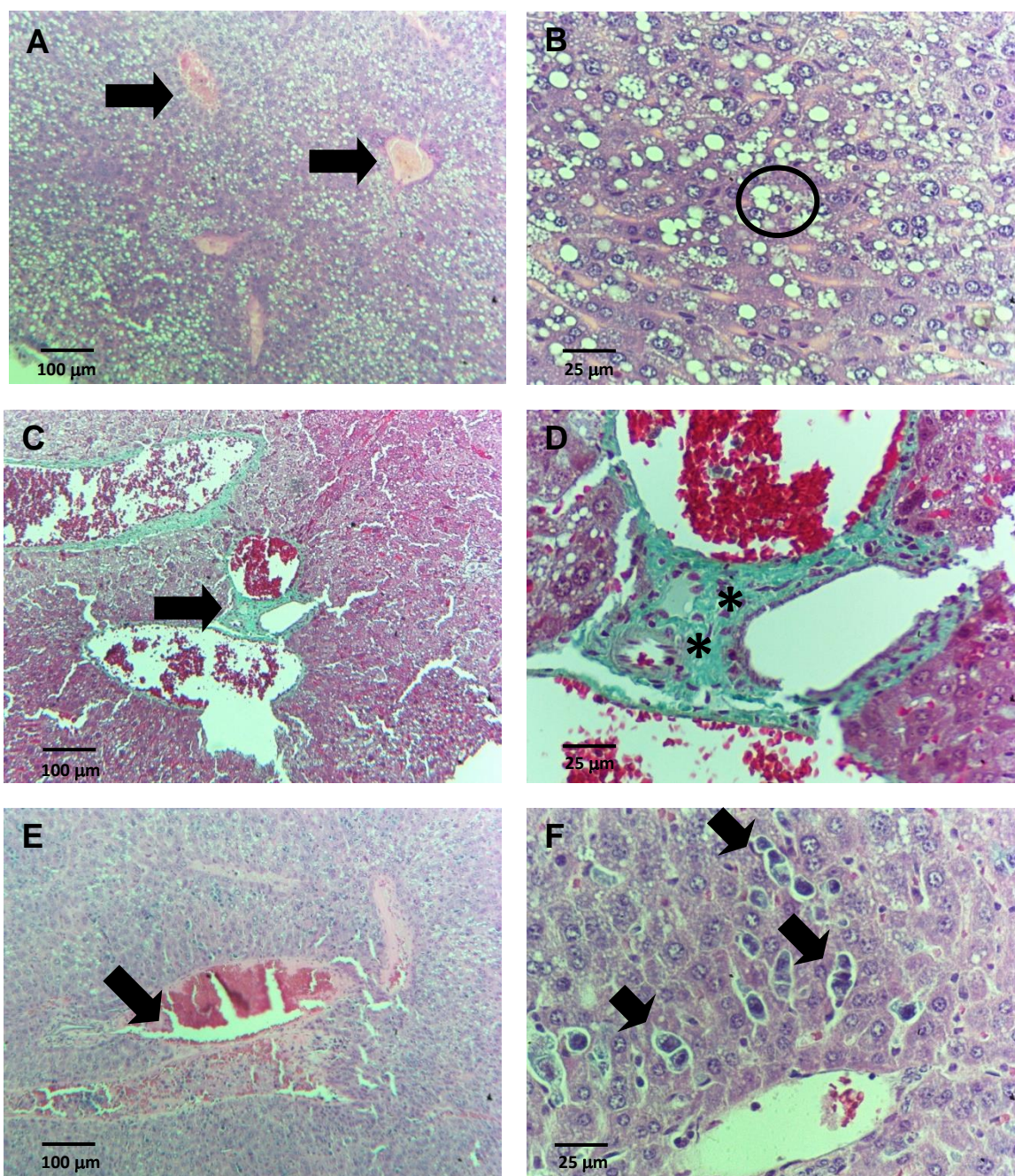
Ao exame de microscopia de luz, os fígados corados em HE dos animais do grupo controle transplantados apresentaram vasos congestionados, visíveis lesões reversíveis, do tipo esteatose micro e macrogoticular caracterizada pelos inúmeros vacúolos esbranquiçados no citoplasma e núcleo celular periférico (Figura 7A e 7B). A organização dos cordões hepáticos direcionadas para as veias hepáticas terminais, de paredes finas permaneceram inalteradas. Não foram encontrados necrose de hepatócitos e atipias celulares. Os espaços portais estavam regularmente distribuídos com a presença da tríade vâsculo-biliar habitual, no entanto a matriz do espaço porta apresentava significativa deposição de colágeno observado nos fígados corados por tricrômico de Gomori, caracterizando a fibrose periportal pela típica coloração azulada nesta área (Figura 7C e 7D).

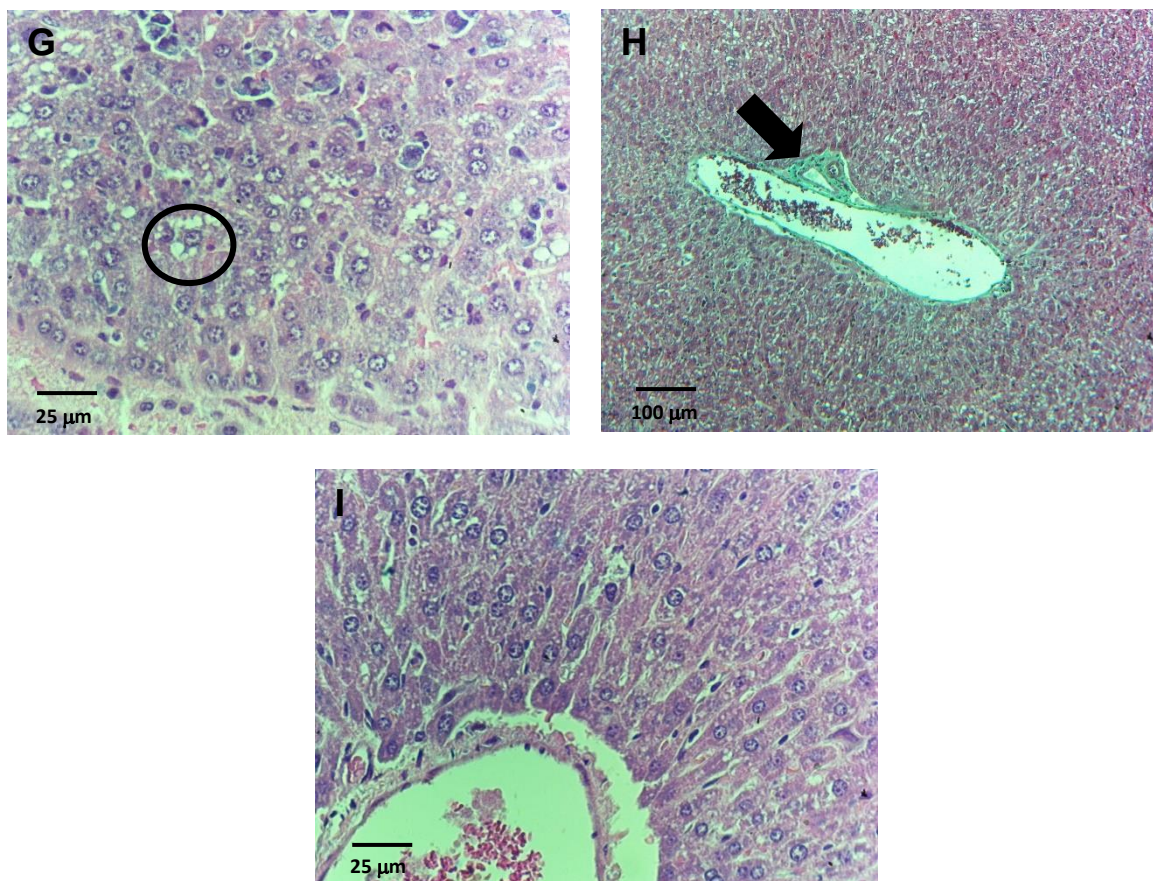
Quando foram avaliados os fígados dos animais tratados com o DE-07 pôde-se observar a presença de discretas alterações histopatológicas. Foram observados alguns vasos congestionados (Figura 7E) e alguns hepatócitos necrosados (Figura 7F). No maior aumento (400x) pode-se observar a formação de algumas gotículas

microgoticulares ricas em lipídeos no citoplasma dos hepatócitos (Figura 7G) característico da esteatose hepática. Também observou-se discreta fibrose periportal vista com tricrômico de Gomori (Figura 7H), no entanto, a organização dos hepatócitos em cordões, convergindo da veia centrolobular, o epitélio da tríade portal, a presença dos sinusoides hepáticos e células de Kupffer permaneceram inalteradas (Figura 7I).

Os rins removidos dos grupos controle transplantado ou com DE-07 não apresentaram diferenças morfológicas entre si sendo assim considerados dentro dos limites da normalidade histológica. Na área cortical dos rins foram observados glomérulos preservados, envolvidos por fina cápsula de Bowman e tufo capilar sustentado por delicado mesângio, túbulos contorcidos proximais numerosos e preservados com epitélio simples cúbico e abundante citoplasma e túbulos distais com citoplasma escasso característico de sua morfologia (Figura 8A, 8C e 8D). Na medula renal os túbulos coletores foram encontrados sustentados por escasso tecido fibroconjuntivo e revestidos por epitélio com altura variável, de colunar a plano, típico (Figura 8B).

Figura 7. Efeito do tratamento com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) na histologia dos fígados de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.

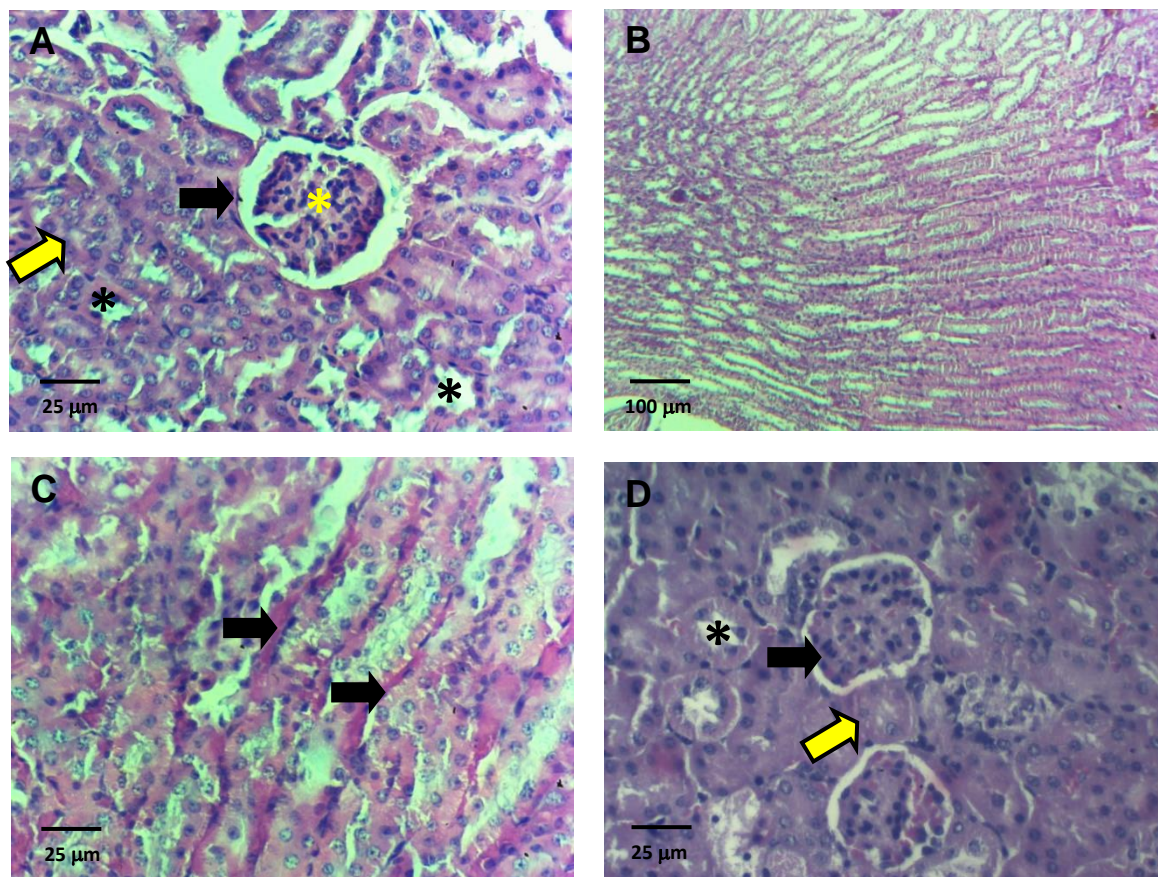




Controle transplantado (A - D): **(A)** Congestão vascular (seta); **(B)** esteatose hepática (círculo); **(C)** discreta fibrose perivascular (seta); **(D)** discreta fibrose perivascular (asteriscos); Grupo tratado com o DE-07 (50 mg/kg) (E - J): **(E)** congestão vascular (seta); **(F)** necrose hepática (setas); **(G)** esteatose hepática (círculo); **(H)** fibrose perivascular (seta); **(I)** hepatócitos organizados em cordões. A, E: HE, 100x; B, F, G, I: HE, 400x; C, H: Tricrômio de Mallory, 100x; D: Tricrômio de Gomori, 400x.

Fonte: Karina Carla de Paula.

Figura 8. Efeito do tratamento com 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07) na histologia dos rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.



Controle transplantado (A e B): **(A)** córtex renal com glomérulo preservado circundado por cápsula de Bowman (seta preta) com tufo capilar interno (asterisco amarelo) e túbulos proximais (seta amarela) e distais (asterisco preto); **(B)** medula renal com túbulos coletores preservados e luz visível. Grupo tratado com DE-07 (50 mg/kg) (C e D): **(C)** epitélio tubular preservado (setas); **(D)** glomérulo preservado circundado por cápsula de Bowman (seta preta) com tufo de capilar interno e túbulos proximais (seta amarela) e distais (asterisco preto) preservados. B, C: HE, 100x; A, D: HE, 400x.

Fonte: Karina Carla de Paula.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Os produtos naturais continuam a servir como importante fonte de drogas antitumorais que são usadas como protótipos para a síntese de moléculas mais ativas e/ou menos tóxicas. Nesse sentido, vários análogos da piperina têm sido estudados quanto à toxicidade e efeitos antitumorais (SANTOS et al., 2018). Com essa perspectiva, o presente trabalho foi realizado para avaliar a toxicidade não clínica do 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07), um derivado semissintético inédito da piperina, bem como o seu potencial antitumoral, e possíveis mecanismos de ação envolvidos, em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.

Os testes de toxicidade não clínica envolvem a investigação, em animais, dos efeitos prejudiciais da substância teste, bem como de mecanismos de toxicidade associados a esse efeito. O principal objetivo destes estudos é determinar a segurança do composto, permitindo a obtenção de um nível de dose inicial seguro para a fase I dos ensaios clínicos (VENKATESAN; RAMANATHAN, 2017).

Um dos parâmetros de toxicidade avaliados nos ensaios não clínicos é a dose letal média (DL₅₀) caracterizada como a quantidade de uma substância que pode causar morte de 50% dos animais experimentais quando administrada em dose única por uma via específica, sendo os animais observados durante um período de tempo especificado (CHAN; HAYES, 1989; ADAMSON, 2016).

Para o presente estudo, inicialmente, foi realizado o teste de toxicidade não clínica aguda com o objetivo de estabelecer doses seguras a serem utilizadas em testes farmacológicos *in vivo* (MOURA et al., 2016). Tal ensaio foi realizado de acordo com o “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos”, elaborado e publicado, em 2013, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Segundo este guia, estudos para a determinação da DL₅₀ não são necessários, podendo ser utilizados métodos alternativos para a estimativa da dose letal envolvendo um menor número de animais, tais como os preconizados nos guias da OECD (ANVISA, 2013).

Nessa perspectiva, utilizou-se o guia nº 423 da OECD (2001) que fornece um procedimento reprodutível, utilizando poucos animais, e que é capaz de classificar as

substâncias de forma semelhante aos outros métodos de avaliação da toxicidade aguda (OECD, 2001).

A dose inicial escolhida para o ensaio foi a dose de 2000 mg/kg, pois estudos anteriores de toxicidade não clínica aguda em camundongos com derivados da piperina indicaram um baixo nível de toxicidade, com DL_{50} estimadas em aproximadamente 5000 mg/kg para o 2-oxo-2-(4-etilfenilamina)-piperinoato de etila (HE03) (SOUSA, 2015) e 2000 mg/kg para o 2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperinoato de etila (HE02) (SANTOS et al, 2018), via intraperitoneal (i.p.).

Com base nos resultados obtidos, DE-07 pode ser considerada uma substância de baixa toxicidade nas condições experimentais avaliadas, uma vez que a DL_{50} foi estimada em torno de 1000 mg/kg, tendo sido classificada na categoria 4 da *Globally Harmonized Classification System* (GHS), segundo o guia 423 da OECD, o que corrobora achados da literatura para outros derivados da piperina (SOUSA, 2015; SANTOS et al., 2018). Ainda, sabe-se que, em geral, se a DL_{50} da substância teste for três vezes maior do que a dose mínima eficaz, a substância é considerada um bom candidato para estudos posteriores (AULETTA, 1995; AMELO; NAGPAL; MAKONNEN, 2014).

Esse resultado permite ainda inferir que o DE-07 apresenta menor toxicidade, em ensaio de toxicidade não clínica aguda em camundongos, que a molécula protótipo, a piperina, tendo em vista que para tal, a DL_{50} foi determinada em torno de 43 mg/kg (i.p.) para machos e 60 mg/kg (i.p.) para fêmeas de camundongos Swiss (PIYACHATURAWAT; GLINSUKIN; TOSKULKAO, 1983).

Diferenças na DL_{50} em espécies distintas podem fornecer indícios para variações na absorção, metabolismo e mecanismos de toxicidade de uma substância (ADAMSON, 2016). Tendo isso em mente, realizou-se o teste de toxicidade em embriões de peixe (teste FET) utilizando o modelo de peixe-zebra (*Danio rerio*) de acordo com o guia nº 236 da OECD (2013) que se destina a determinar a toxicidade aguda ou letal de produtos químicos em estágios embrionários dessa espécie (OECD, 2013).

O teste FET espalhou-se mundialmente como um método confiável para avaliação de risco (eco)toxicológico. No entanto, os testes com embriões têm sido amplamente aplicados no âmbito do registo, avaliação, autorização e restrição de produtos químicos (STELZER et al., 2018).

De acordo com essa metodologia, os embriões de peixe-zebra recém-fertilizados devem ser expostos ao produto químico em teste por um total de 96 h. A cada 24 h, são realizadas observações dos indicadores de letalidade (BRAUNBECK et al., 2014) que incluem a coagulação do embrião, falta de somitos, não descolamento da base cauda e falta de batimentos cardíacos (BELANGER; RAWLINGS; CARR, 2013). No final do período de exposição, a toxicidade aguda é determinada com base em um resultado positivo em qualquer um dos indicadores de letalidade e a concentração letal média (CL₅₀) é estimada (BRAUNBECK et al., 2014).

Considerando o resultado observado no ensaio de toxicidade aguda não clínica em camundongos, sugerindo que o DE-07 apresenta baixa toxicidade, foi realizado o tratamento de embriões do peixe-zebra com a concentração teste limite recomendada pelo guia nº 236 da OECD. O tratamento com 100 µg/mL de DE-07 não causou morte dos embriões/larvas teste, permitindo inferir que, nesse ensaio, a CL₅₀ para 96 h do DE-07 é estimada em concentração maior que 100 µg/mL suportando, portanto, o indicativo de baixa toxicidade não clínica dessa molécula. Em seu trabalho, Gao e colaboradores (2014) avaliaram a toxicidade aguda de sete moléculas com reconhecida atividade antitumoral em embriões de peixe-zebra. Esses pesquisadores obtiveram valores de CL₅₀ variando de aproximadamente 0,24 a 17,70 µg/mL em 72 horas após exposição dos embriões/larvas à essas moléculas. O paclitaxel, fármaco amplamente utilizado para o tratamento de diversos tumores, apresentou CL₅₀ aproximada em 1,10 µg/mL, caracterizando significativa letalidade dessa molécula frente a embriões de peixe-zebra.

Muitos fármacos antineoplásicos são agentes genotóxicos e induzem apoptose em células tumorais em resposta a danos causados ao DNA (QUISPE-TINTAYA et al., 2018). Contudo, esse efeito também pode ser causado em células não tumorais, o que tem especial importância pela possibilidade de ocorrência de alterações genéticas nessas células e/ou indução de tumores secundários em pacientes em tratamento quimioterápico (GAJSKI et al., 2016). Nesse sentido, a avaliação do potencial genotóxico de novos candidatos a fármacos antineoplásicos é essencial.

Para a investigação do potencial genotóxico do DE-07, foi utilizado o ensaio do micronúcleo em sangue periférico de camundongos Swiss. O ensaio do micronúcleo tem sido amplamente utilizado como o teste *in vivo* mais confiável para avaliar a indução de aberrações cromossômicas, um dos principais indicadores de

mutagenicidade (HAYASHI, 2016), sendo amplamente utilizado e aceito por agências internacionais e governamentais como parte dos ensaios necessários para avaliar a genotoxicidade de novos produtos químicos (CHOY, 2001; BRITO et al., 2018).

Os micronúcleos são pequenos corpos de cromatina extranucleares envolvidos por um envelope nuclear, sendo fragmentos de cromossomos acêntricos ou cromossomos inteiros que ficaram para trás na anáfase de células em divisão e não foram incluídos em um dos dois núcleos-filhos na telófase. Os mecanismos subjacentes à indução de micronúcleos são bem compreendidos, sabendo-se que agentes clastogênicos induzem fragmentos cromossômicos e agentes aneugênicos interferem no aparato mitótico e levam à falta de segregação de cromátides ou de cromossomos inteiros durante a mitose. Em ambos os casos, a cromatina não é adequadamente distribuída aos núcleos filhos e permanece no citoplasma como um micronúcleo (FENECH, 2007; KIRSCH-VOLDERS et al., 2011; HINTZSCHE et al., 2017).

A droga padrão utilizada nesse ensaio foi a ciclofosfamida, um agente alquilante amplamente utilizado na quimioterapia antineoplásica (PONTICELLI; ESCOLI; MORONI, 2018). Ao entrar na célula, esse fármaco é metabolizado à mostarda de fosforamida (AHLMANN; HEMPEL, 2016), o agente capaz de formar ligações cruzadas entre e dentro das fitas de DNA nas posições da guanina, levando a célula à apoptose (PONTICELLI; ESCOLI; MORONI, 2018). Contudo, seus efeitos genotóxicos não são seletivos para as células tumorais, afetando também as células saudáveis, causando efeitos adversos como o surgimento de tumores e sendo, desta forma, considerado como um agente carcinogênico (LEKSKULCHAI, 2016).

Considerando que o DE-07 não provocou aumento do número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos, pode-se inferir que essa substância não apresenta potencial genotóxico, no modelo avaliado, corroborando com o resultado observado para o derivado HE03, em ensaio de micronúcleo em sangue periférico de camundongos Swiss (SOUSA, 2015).

Conforme observado na literatura, os estudos de genotoxicidade da piperina mostraram que essa molécula não apresenta potencial genotóxico significativo, como evidenciado pelo teste de Ames (ANDREWS et al., 1980; KAREKAR et al., 1996) e em ensaios de micronúcleo *in vitro* (SINGH; REEN; WIEBEL, 1994) e *in vivo* (NARASIMHAMURTHY, 1990; THIEL et al., 2014). Além disso, é reportada a atividade

protetora da piperina contra a genotoxicidade induzida por certos carcinógenos (SELVENDIRAN et al. 2006) e pela aflotoxina B1 *in vitro* (REEN; WIEBEL; SINGH, 1997) e *in vivo* (CARDOSO et al., 2016).

Considerando os resultados obtidos na avaliação da toxicidade não clínica do DE-07, foi possível determinar doses seguras para realização dos ensaios farmacológicos.

A avaliação da atividade antitumoral *in vivo* foi realizada utilizando-se o modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE), um adenocarcinoma mamário murino espontâneo (MISHRA et al., 2018), que espalhou-se rapidamente pelos institutos de pesquisa em todo o mundo, tornando-se um dos modelos de tumor experimentais mais utilizados. Esse tumor é referido como um carcinoma indiferenciado, originalmente hiperdiploide, com alta capacidade de transplante, não-regressão, rápida proliferação e que não possui antígeno de transplante tumor-específico (TSTA) (OZASLAN et al., 2011), podendo ser mantido na forma ascítica por transplantes intraperitoneais seriados (JAGANATHAN et al., 2010).

A droga padrão utilizada foi o 5-fluorouracil (5-FU), um agente quimioterápico antimetabólito, amplamente utilizado no tratamento de vários cânceres sólidos, como carcinoma colorretal, de mama, de cabeça e pescoço, estômago e pâncreas (JATTO; OBOH; NTEKIM, 2017). Dentro da célula, o 5-FU é convertido aos metabólitos ativos 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP), 5-fluorouridina-5'-trifosfato (FUTP) e 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (FdUTP) ao DNA que causam interferência na síntese de RNA (THOMAS et al., 2016) e na função da timidilato sintase, o que resulta na inibição da síntese e função do DNA (CHANDRAN et al., 2017). Em adição, esse fármaco também possui atividade antiangiogênica relatada (BASAKI et al., 2001).

Considerando que o tratamento de sete dias com DE-07 em animais transplantados com CAE reduziu significativamente os parâmetros de massa tumoral e viabilidade e total celular, pode-se inferir que DE-07 apresenta significante atividade antitumoral *in vivo*. Ainda, considerando que foram observadas diferenças significativas nos parâmetros alterados entre as doses de 12,5 ou 25 mg/kg e a dose de 50 mg/kg, esta última foi selecionada para o estudo de possíveis mecanismos de ação antitumorais, uma vez que esta dose produziu o efeito farmacológico máximo.

Diversos trabalhos na literatura têm demonstrado a atividade antitumoral da piperina. Em estudo realizado por Lai e colaboradores (2012) foi observado que essa

molécula inibiu o crescimento de células 4T1 (carcinoma mamário murino) *in vitro* e *in vivo*. No ensaio *in vivo*, a piperina foi administrada diretamente no tumor, tendo sido observada redução significativa do volume tumoral, especialmente no grupo tratado com a dose de 5 mg/kg. Ao investigar a atividade antitumoral do extrato etanólico dos frutos de *Piper longum* e da piperina, Sunila e Kuttan (2004) demonstraram que tanto o extrato quanto a piperina apresentam atividade citotóxica frente ao linfoma ascítico de Dalton e ao carcinoma ascítico de Ehrlich *in vivo* e *in vitro*. Em adição, a administração de doses de 50 ou 100 mg/kg de piperina e da pipartina (piperlongumina), um outro alcaloide amida isolado de *Piper longum* (PISKA et al., 2018), demonstraram inibir significativamente o tumor sólido de sarcoma 180 (BEZERRA et al., 2006).

No contexto das linhagens tumorais humanas, a piperina demonstrou potencial citotóxico frente: linhagem de tumor ovariano A2780 (SI et al., 2018); células MDA-MB-231, MDA-MB-468, T-47D e MCF-7 de câncer de mama (GREENSHIELDS et al., 2015); linhagem de câncer de mama com superexpressão de HER2 (SKBR3) (DO et al., 2013); células DU145, PC-3 e LNCaP de câncer prostático (OUYANG et al., 2013); e contra células HeLa, uma linhagem de adenocarcinoma cervical (PAARAKH et al., 2015).

Adicionalmente, trabalhos tem demonstrado a atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro* de derivados da piperina. Como observado por Santos e colaboradores (2018) e Sousa (2015), os derivados semissintéticos HE02 e HE03 apresentaram significativa atividade antitumoral em modelo de CAE especialmente nas doses de 12,5 e 25 mg/kg. A avaliação da atividade antitumoral de uma série de derivados sintetizados pela conjugação da piperina com aminoácidos, demonstrou inibição significativa da proliferação celular frente a linhagens de neuroblastoma (IMR-32), mama (MCF-7), próstata (PC-3, DU -145), cólon (Colo-205) e fígado (Hep-2) com alguns desses derivados apresentando atividade citotóxica melhor que a piperina (RAO et al., 2012).

A angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (BLOCH; HAREL, 2016), desempenha um papel fundamental na progressão do tumor e na metástase (BALTRUNAITE et al., 2017). Atualmente, a terapia antiangiogênica representa uma das estratégias antitumorais mais utilizadas, com a maioria das terapias aprovadas almejando a via de sinalização do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (RIVERA et al, 2015), tendo em vista a sua expressão aumentada na maioria dos cânceres humanos (JAYSON et al., 2016). Em

muitos casos, quando adicionados à quimioterapia padrão, os agentes antiangiogênicos oferecem uma melhora na eficácia terapêutica contra diferentes tipos de câncer, tais como os cânceres colorretal, de mama, de pulmão de células não-pequenas e o carcinoma hepatocelular (MAJ; PAPIERNIK; WIETRZYK, 2016).

Nesse estudo, os dados de avaliação da microdensidade vascular permitiram a observação de significativo percentual de inibição da área vascular peritoneal do grupo tratado com o DE-07, permitindo inferir que o efeito antitumoral dessa molécula envolve ação antiangiogênica. O resultado obtido nesse ensaio encoraja a realização de estudos adicionais, no intuito de caracterizar os possíveis alvos envolvidos com a inibição da angiogênese pelo DE-07.

A propriedade antiangiogênica da piperina também foi reportada ao demonstrar que essa molécula atua bloqueando múltiplos aspectos do processo angiogênico *in vitro* e *ex vivo*, bem como suprime a angiogênese induzida por células de câncer de mama em ensaio *in vivo*, possivelmente por mecanismos de inibição da fosforilação da Akt (DOUCETTE et al., 2013). Foi relatado que a piperlongumina apresentou atividade antiangiogênica ao inibir a proliferação, migração, invasão e a formação do tubo vascular de células endoteliais de veia umbilical humana (LIU et al., 2014). Os derivados da piperina HE02 e HE03 também mostraram potencial efeito inibidor da angiogênese em modelo de CAE (SOUSA, 2015; SANTOS et al., 2018).

Principalmente geradas nas mitocôndrias, as espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas como parte da respiração normal e do metabolismo energético (VICHAYA et al., 2015). Em baixos níveis, podem atuar como mensageiros de sinalização celular por meio da oxidação reversível de grupos tióis proteicos, modificando a estrutura e a função das proteínas. Em níveis mais altos, essas moléculas interrompem os processos celulares atacando proteínas, lipídios e DNA de forma não específica (SCHUMACKER et al., 2015).

Nas células tumorais, o crescimento e a proliferação são estimulados por um aumento modesto dos ROS intracelulares. Por outro lado, a apoptose é induzida em níveis mais elevados (DHARMARAJA, 2017). Embora sejam observados altos níveis de ROS nas células tumorais, sugere-se que essas células sejam mais vulneráveis ao aumento intracelular de ROS em comparação às células não transformadas. Portanto, o tratamento do câncer por meio do aumento da produção intracelular de ROS representa uma abordagem eficiente (TONG et al., 2015).

Foi observado que o DE-07 induziu aumento da produção de ROS, permitindo inferir que este é um dos mecanismos de ação antitumorais dessa molécula. Estudo realizado por Grinevicius e colaboradores (2016), mostrou que o extrato etanólico de *Piper nigrum* tem efeito citotóxico contra células de câncer de mama MCF-7 e efeito antitumoral *in vivo* em modelo de CAE, provavelmente devido à superprodução de ROS, que induziu estresse oxidativo afetando as principais proteínas envolvidas na parada do ciclo celular em G1/S e desencadeando apoptose. Os dados do estudo realizado por Yaffe e colaboradores (2013) comprovam que a piperina causou apoptose de células de câncer retal por indução de estresse oxidativo. Além disso, em outro estudo, foi observado que o uso da piperina aumentou significativamente a apoptose em células submetidas à radiação, presumivelmente através de geração melhorada de ROS nessas células (TAK; LEE; PARK, 2012). Estudo realizado por Raj e colaboradores (2011) mostrou que o estresse oxidativo causado pela geração seletiva de ROS nas células tumorais é um dos mecanismos citotóxicos da piperlongumina. Em adição, o efeito indutor do estresse oxidativo foi um dos mecanismos de ação antitumorais verificados para o derivado HE02 em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (SANTOS et al., 2018).

Atualmente, tem-se considerado o tumor como uma estrutura semelhante a um órgão que resulta da coevolução das células malignas e de seu ambiente direto (MEURETTE; MEHLEN, 2018). Esse ambiente, denominado de microambiente tumoral, compreende vários tipos de células, como as células endoteliais, os fibroblastos e as células imunes, bem como, componentes extracelulares a exemplo dos fatores de crescimento, dos hormônios e das citocinas (WU; DAI, 2017).

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular que medeiam a comunicação célula-célula. Durante a inflamação crônica, elas podem induzir transformação celular e malignidade, mas, a depender do microambiente tumoral, podem modular uma resposta antitumoral, o que está condicionado ao equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias, às suas concentrações relativas, ao conteúdo de expressão dos seus receptores e ao estado de ativação das células vizinhas (ZAMARRON; CHEN, 2011; LANDSKRON et al., 2014).

Pensando nisso, no presente trabalho foi realizada a avaliação da expressão de algumas citocinas, a saber: interleucina 1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 (IL-12) e quimiocina

(motivo CC) de ligante 2 (CCL2), objetivando uma melhor caracterização do efeito antitumoral do DE-07.

A IL-1 β , assim como o TNF- α , é uma citocina pró-inflamatória que estimula a atividade fagocitária dos macrófagos e neutrófilos, bem como a liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por essas células (NETEA et al., 2010). Outros dados da literatura, apontam para a atividade antiangiogênica da IL-1 β ao mostrar que ela atua inibindo o crescimento endotelial *in vitro* e *in vivo* por indução da diminuição da expressão dos sítios de ligação do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) de alta afinidade no endotélio (COZZOLINO et al., 1990).

O envolvimento do TNF- α com a liberação de ROS foi demonstrado por Kim e colaboradores (2010) que evidenciaram a relação entre a produção dessa citocina e a redução do potencial de membrana mitocondrial e geração de ROS, resultando em morte celular. Além disso, assim como evidenciado para a IL-1 β , o TNF- α também apresenta atividade antiangiogênica tendo sido relatado por Havell e colaboradores (1988) o efeito citotóxico dessa citocina ao induzir necrose tumoral ocasionada pela destruição dos vasos sanguíneos associados ao tumor de sarcoma SA1.

No presente estudo, foi observado que o DE-07 modula a resposta inflamatória pela indução do aumento da produção de IL-1 β e do TNF- α , o que pode estar envolvido ao aumento da geração de ROS e ao efeito antiangiogênico observado após o tratamento com esse composto, no modelo experimental utilizado.

O tratamento com o derivado semissintético HE02 também esteve associado ao aumento da IL-1 β e do TNF- α , em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich. Tal resultado foi associado ao efeito imunomodulador dessa molécula que polarizou o perfil citotóxico Th1 contra as células tumorais (SANTOS et al., 2018).

A IL-4 é um agente antitumoral ativo com potente atividade inibidora da formação de novos vasos sanguíneos (VOLPERT et al., 1998). Dados da literatura mostram que essa citocina inibiu significativamente a proliferação de células endoteliais de veia umbilical humana induzida pelo VEGF e pelo fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) (LEE et al., 2002). Em adição, a IL-4 reduz a capacidade dos macrófagos de promover a angiogênese ao regular negativamente a tradução do fator 1 α induzido pela hipóxia (HIF-1 α) em condições hipóxicas (DEHNE et al., 2014). Considerando o aumento da concentração da IL-4 após tratamento com DE-07 e os seus reconhecidos efeitos antiangiogênicos, é possível inferir que a

redução da microdensidade vascular observada neste trabalho pode ser, em parte, influenciada pela ação dessa citocina. Dados da literatura apontam a atividade imunomoduladora da piperina como uma consequência do estímulo da produção de IL-4 por células Th2 (KUMAR; SASMAL; SHARMA, 2015).

Um dos problemas do uso de agentes quimioterápicos é a não seletividade de sua ação para as células tumorais, levando também a eliminação de células saudáveis, especialmente aquelas que se dividem com frequência (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2013). Dessa forma, é importante compreender como os agentes quimioterápicos afetam os diferentes órgãos (SHARMA et al., 2014).

Prosseguindo com o estudo da toxicidade não clínica do DE-07, realizou-se a avaliação dos possíveis efeitos tóxicos dessa molécula após tratamento antitumoral. Inicialmente foi avaliado o consumo de água, ração e evolução ponderal. Considerando que a diminuição significativa do consumo de água e ração do grupo tratado com DE-07 não foi acompanhada de alterações significativas no peso final dos animais, considera-se que tais resultados não possuem importância clínica. Esse resultado mostra-se de relevada importância tendo em vista que a administração sistêmica de quimioterapia pode levar à toxicidade gastrointestinal que, por sua vez, afeta o estado nutricional dos pacientes, sendo a anorexia induzida pela quimioterapia, um dos sintomas comumente observados no paciente oncológico (TONG; ISENRING; YATES, 2009; DAVIDSON et al., 2012).

Nesse trabalho, os índices do coração, baço, timo, fígado e rins dos animais tratados com DE-07 não foram alterados. Dados da literatura mostram que a piperina, semelhantemente, não induziu alterações nos pesos do fígado e rins de camundongos transplantados com o tumor sarcoma 180. Contudo, ao avaliar o peso do baço, observou-se redução significativa no índice desse órgão (BEZERRA et al., 2006). Ao avaliar os órgãos dos animais submetidos ao tratamento com os derivados HE02 e HE03, é possível observar diferentes efeitos dessas moléculas no índice do baço. Nesse órgão, o HE02 foi capaz de causar redução do seu peso, o que foi traduzido a uma possível diminuição na população de células periarteriolares da bainha linfóide, um efeito já relatado ao tratamento com a piperina (BEZERRA et al., 2006; SANTOS, 2017). De maneira oposta, o derivado HE03 causou hipertrofia desse órgão, associada a uma provável imunomodulação positiva no sentido de ajudar o organismo no combate ao tumor, tendo em vista que esse derivado também causou linfocitose

(SOUSA, 2015). Além disso, também foram observadas alterações nos índices do timo dos animais tratados com ambas as moléculas (SOUSA, 2015; SANTOS, 2017).

O fígado é um dos principais órgãos responsáveis pela depuração de fármacos e pela função sintética de muitas vias bioquímicas. Muitas drogas quimioterápicas requerem adequada função hepática para serem metabolizadas e alguns desses agentes podem causar lesão hepática significativa (SHARMA et al., 2014). O metotrexato, por exemplo, pode causar elevações nos níveis das transaminases hepáticas, a alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST). No entanto, mais preocupante é a sua associação com alterações na histologia do fígado, em particular, fibrose e cirrose (BATH et al., 2014).

ALT e AST são enzimas altamente concentradas no fígado e catalisam a geração de ácido pirúvico e oxalacético, respectivamente (XU; HIGGINS; CEMBROWSKI, 2015). Apesar de não serem marcadoras específicas da função hepática (BLAUW et al., 2018), essas enzimas são comumente solicitadas para verificar a integridade do hepatócito, tendo em vista que, quando ocorre lesão hepatocelular, elas são liberadas no plasma, sendo observado aumento de sua atividade (XU; HIGGINS; CEMBROWSKI, 2015).

O tratamento com DE-07 não levou a alterações na atividade plasmática da ALT. Em relação à AST, foi observada redução significativa em sua atividade, contudo, tal valor encontra-se dentro da faixa de normalidade para camundongos fêmeas da espécie Swiss (GAD, 2007).

A análise histológica dos fígados dos animais tratados com DE-07 evidenciou discretas alterações histológicas. A presença de congestão vascular, de microgotículas ricas em lipídeos no citoplasma dos hepatócitos e de fibrose periportal também foram alterações observadas no grupo controle, estando, possivelmente, associadas ao implante do tumor e não ao tratamento com o DE-07. A necrose de alguns hepatócitos foi observada no grupo tratado com a substância teste, mas, por ser um achado discreto, não possui significado clínico.

A congestão vascular, particularmente, pode estar associada à ascite, tendo em vista que esta é uma das principais manifestações da hipertensão portal (MARUYAMA et al., 2015). Em adição, tal resultado pode explicar a ausência de efeito do DE-07 no volume tumoral, mesmo tendo sido observada reduções significativas da viabilidade e do total celular. Coincidindo com esse resultado, o tratamento com HE02

causou congestão portal e ascite o que foi refletido em significativo volume intra-abdominal (SANTOS, 2017).

Em estudo realizado em 1983, Piyachaturawat e colaboradores evidenciaram que a administração subaguda da piperina em ratos acarretou leve infiltração gordurosa no fígado e necrose celular em corpos lúteos. Após análises histopatológicas, Bezerra e colaboradores (2006) evidenciaram em seu trabalho que, após tratamento com a piperina, o fígado de camundongos transplantados com tumor de sarcoma 180 foi o principal órgão afetado pela toxicidade dessa molécula. Esses efeitos incluíram hiperplasia de células de Kupffer, tratos portais e congestão venosa centrolobular, infiltrado focal de células inflamatórias crônicas, intensa degeneração por balão dos hepatócitos, esteatose microvesicular e hemorragia sinusoidal. Em contraposição, o tratamento com a piperina na dose de 50 mg/kg não evidenciou alterações significativas nas atividades plasmáticas de ALT e AST (BEZERRA et al., 2008).

Os rins são órgãos dinâmicos, responsáveis pela manutenção da homeostase de todo o organismo, incluindo a regulação da pressão arterial, o pH do fluido extracelular e as concentrações plasmáticas de nutrientes e eletrólitos, servindo como um órgão primário de eliminação e desintoxicação xenobiótica (SOHN et al., 2013; ASCHAUER et al., 2015; GABELOVA et al., 2018).

A avaliação da função renal é realizada por meio do histórico e exame clínico do indivíduo em conjunto com testes laboratoriais que incluem a determinação dos níveis plasmáticos de ureia e creatinina (STEWART; PASHA, 2018). A ureia é o produto orgânico nitrogenado final e não-tóxico do metabolismo proteico (PUNDIR; JAKHAR; NARWAL, 2018). É excretada pelo rim, de modo que a sua concentração sérica é relativamente constante. Logo, em condições de disfunção renal, é possível observar alta concentração de ureia no sangue (ZHANG; GUO; ZHANG, 2017). A creatinina, por sua vez, é formada a partir da quebra da creatina e da fosfocreatina nos músculos (STEWART; PASHA, 2018). Ela é transportada pela corrente sanguínea principalmente para os rins, onde é filtrada e excretada. Como um indicador chave da função renal, o nível de creatinina é um parâmetro essencial para diagnosticar e monitorar doenças renais agudas e crônicas, bem como o efeito de drogas (GUINOVART et al., 2017).

O uso de fármacos antitumorais pode ocasionar diferentes formas de toxicidade renal, como danos tubulares, intersticiais, glomerulares ou vasculares. A cisplatina, por exemplo, um agente quimioterápico amplamente utilizado para tratamento do câncer de pulmão, tem reconhecida nefrotoxicidade (ASSAYAG et al., 2017), sendo este o principal efeito colateral limitante de sua dose (SANTOS et al., 2012; SATO et al., 2016).

A administração de DE-07 não levou a alterações nas concentrações séricas de ureia e creatinina. Em adição e corroborando com os resultados bioquímicos de função renal, o exame histológico dos rins dos animais tratados com DE-07 não evidenciou alterações morfológicas. Tais dados permitem inferir que essa molécula apresenta baixa toxicidade renal.

Os derivados da piperina HE02 e HE03 promoveram aumento dos níveis séricos da ureia não tendo sido acompanhado de alteração dos valores de creatinina, nem de mudanças morfológicas na histologia renal, não sendo possível afirmar um efeito nefrotóxico dessas moléculas após tratamento antitumoral (SOUSA, 2015; SANTOS et al., 2018).

Corroborando com os resultados obtidos para o DE-07, o tratamento com a piperina na dose de 50 mg/kg não causou alterações significativas na concentração sérica de ureia de animais transplantados com tumor sarcoma 180 (BEZERRA et al., 2008). No entanto, a análise histopatológica dos rins dos animais tratados com piperina e piplartina, em trabalho realizado por Bezerra e colaboradores (2006), mostrou discretas alterações hidrópicas do epitélio tubular proximal e hemorragia glomerular e tubular, efeitos estes, mais intensos nos animais tratados com a piplartina.

A quimioterapia pode prevenir a replicação celular e induzir a apoptose ao danificar o DNA. Como as células que estão dividindo-se ativamente são sensíveis aos danos no DNA, a quimioterapia é eficaz contra neoplasias de rápido crescimento. Outras células que se dividem rapidamente, como as células-tronco da medula óssea, também são afetadas pelas drogas quimioterápicas resultando em mielossupressão, que é um dos efeitos colaterais mais comuns da quimioterapia (WANG; LEE; LIAO, 2015).

Nas análises hematológicas, o eritrograma compreende a avaliação morfológica e contagem total dos eritrócitos, a dosagem de hemoglobina e a

determinação do hematócrito (PRADO et al., 2016). O hematócrito (HCT) representa a porcentagem de volume da fração de eritrócitos no volume total de sangue (MAHINY; KARIKO, 2016), sendo calculado como o produto da contagem de glóbulos vermelhos pelo volume corpuscular médio (VCM) (MEANS, 2011). A determinação do HCT é geralmente realizada para selecionar doadores de sangue e diagnosticar condições médicas que afetam a quantidade de hemácias. Deficiências em nutrientes dietéticos como ferro, folato ou vitamina B12, má absorção, excesso de sangue, leucemia e aumento da destruição dos eritrócitos causam alterações na morfologia e números das hemácias e, conseqüentemente, diminuição dos valores do hematócrito, que afetam adversamente as concentrações de hemoglobina e levam a várias formas de anemia. Por outro lado, um aumento no valor do hematócrito pode estar relacionado a policitemia (QUINN et al., 2016), cianose, desidratação, doença cardiovascular descompensada e fibrose pulmonar (FERNANDEZ; NORMAN; FLAXMAN, 1985; LEE et al., 2015).

No presente estudo, foi observado que o DE-07 causou aumento do HCT, no entanto, esse efeito conduz os valores correspondentes para próximo dos limites de normalidade para a espécie (GAD, 2007). Além disso, por não ter sido observada alteração em nenhum outro parâmetro do eritrograma, pode-se considerar que esse resultado não tem significado clínico.

O leucograma compreende a contagem total de leucócitos e a contagem diferencial de seus subtipos celulares que incluem os neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos (SHI et al., 2013). O tratamento com DE-07 induziu leucocitose acompanhada de linfocitopenia. Assim como para o DE-07, o tratamento com o HE02 também induziu aumento significativo dos leucócitos, podendo este efeito estar relacionado à citotoxicidade dessas moléculas (SANTOS, 2017). Apesar da redução observada para os linfócitos, o valor percentual dessas células permaneceu dentro do intervalo de normalidade para a espécie e, dessa forma, considera-se que não há significado clínico para esse achado. Em adição, o tratamento com o derivado HE02 causou neutrofilia, com valores acima da faixa de normalidade para a espécie (SANTOS, 2017).

Ainda, e de modo oposto ao observado para o DE-07 e HE02, o HE03 induziu redução da contagem total dos leucócitos e aumentou o percentual de linfócitos que, em adição, foram acompanhados de redução significativa do percentual dos

neutrófilos que, particularmente, esteve abaixo da faixa de normalidade para a espécie (SOUSA, 2015). Outrossim, dados da literatura evidenciam o efeito mielossupressor da piperina ao provocar diminuição da contagem de eritrócitos e de leucócitos, bem como da dosagem de hemoglobina (DOGRA et al., 2004). Esses dados permitem inferir que o DE-07 causa menor toxicidade hematológica que os seus análogos estruturais e a sua molécula protótipo, a piperina.

Diante do exposto, pode-se inferir que o presente trabalho contribui para o crescimento do arsenal de novos candidatos à fármacos antitumorais, ao apresentar dados relevantes relacionados à significativa atividade antitumoral e baixa toxicidade não clínica de um novo derivado semissintético da piperina, o DE-07. Adicionalmente, sugere-se que a substituição do anel piperidínico por um diéster em DE-07 reduziu sua toxicidade em relação ao composto original.

Esses dados incentivam a realização de testes não clínicos adicionais para melhor caracterização da toxicidade e do potencial farmacológico do DE-07.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nos estudos realizados, pode-se concluir que o composto 4-(4-nitrobenzoato)-piperinoato de butila (DE-07):

- Apresentou baixa toxicidade não clínica aguda em camundongos;
- Apresentou baixa toxicidade aguda em embriões/larvas de peixe-zebra;
- Não apresentou genotoxicidade em teste de micronúcleo em camundongos;
- Apresentou atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich em camundongos;
- Exerceu o seu efeito antitumoral por inibição da angiogênese, indução do estresse oxidativo e modulação da inflamação no microambiente tumoral via aumento dos níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-4;
- Apresentou baixa toxicidade após tratamento em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich em camundongos, considerando parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos.

Referências

REFERÊNCIAS

ADAMSON, R. H. The acute lethal dose 50 (LD₅₀) of caffeine in albino rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 80, p. 274-276, 2016.

AGRAWAL, S. S.; SARASWATI, S.; MATHUR, R.; PANDEY, M. Cytotoxic and antitumor effects of brucine on Ehrlich ascites tumor and human cancer cell line. **Life Sciences**. v. 89, p. 147-158, 2011.

AHLMANN, M.; HEMPEL, G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 78, n. 4, p. 661-671, 2016.

AL-BAGHDADI, O. B.; PRATER, N. I.; SCHYF C. J. V.; GELDENHUYS, W. J. Inhibition of monoamine oxidase by derivatives of piperine, an alkaloid from the pepper plant *Piper nigrum*, for possible use in Parkinson's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 23, p. 7183-7188, 2012.

AMELO, W.; NAGPAL, P.; MAKONNEN, E. Antiplasmodial activity of solvent fractions of methanolic root extract of *Dodonaea angustifolia* in *Plasmodium berghei* infected mice. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 462, 2014.

AMIRKIA, V.; HEINRICH, M. Natural products and drug discovery: a survey of stakeholders in industry and academia. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 237, 2015.

ANDREWS, A. W.; FORNWALD, J. A.; LIJINSKY, W. Nitrosation and mutagenicity of some amine drugs. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 52, n. 2, p. 237-244, 1980.

ANSARIZADEH, F.; SINGH, M.; RICHARDS, D. Modelling of tumor cells regression in response to chemotherapeutic treatment. **Applied mathematical modelling**, v. 48, p. 96-112, 2017.

ANVISA. **Guia para condução de estudos não-clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília: Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF, 2013.

ASSAYAG, M.; ROUVIER, P.; GAUTHIER, M.; COSTEL, G.; CLUZEL, P.; MERCADAL L.; DERAY, G.; BAGNIS, C. I. Renal failure during chemotherapy: renal biopsy for assessing subacute nephrotoxicity of pemetrexed. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 770, 2017.

AREND, W. P.; PALMER, G.; GABAY, C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. **Immunological Reviews**, v. 223, n. 1, p. 20-38, 2008.

ASCHAUER, L.; LIMONCIEL, A.; WILMES, A.; STANZEL, S., KOOP-SCHNEIDERE, A.; HEWITT, P.; LUKAS, A.; LEONARD, M. O.; PFALLER, W.; JENNINGS, P.

Application of RPTEC/TERT1 cells for investigation of repeat dose nephrotoxicity: a transcriptomic study. **Toxicology in Vitro**, v. 30, n. 1, p. 106-116, 2015.

ATAWODI, S. E. Nigerian foodstuffs with prostate cancer chemopreventive polyphenols. **Infectious Agents and Cancer**. BioMed Central, 2011. p. S9.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.; LINDER, T.; WAWROSCHE, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, B.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

AULETTA, C. S. **Acute, subchronic, and chronic toxicology**. CRC Press: London, 1995.

BAHRAMI, B.; HOJJAT-FARSANGI, M.; MOHAMMADI, H.; ANVARI, E.; GHALAMFARSA, G.; YOUSEFI, M.; JADIDI-NIARAGH, F. Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy. **Immunology Letters**, v. 190, p. 64-83, 2017.

BALTRUNAITE, K.; CRAIG, M. P.; DESAI, S. P.; CHATURVEDI, P.; PANDEY, R. N.; HEGDE, R. S.; SUMANAS, S. ETS transcription factors Ets2 and Fli1b are required for tumor angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 20, n. 3, p. 307-323, 2017.

BARROS, C.S.; GOMES, M. W. L.; GOMES, R. S. P.; MELCHIADES, V.; NOGUEIRA, C. C. R.; CIRNE-SANTOS, C. C.; GARRIDO, V.; PINTO, C. E. C.; TEIXEIRA, V. L.; PAIXÃO, I. C. N. P. Acute toxicity evaluation of ethanol extract of red algae, *Osmundaria obtusiloba*, in BALB/c mice. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 12, n. 17, p. 217-221, 2018.

BATH, R. K.; BRAR, N. K.; FOROUHAR, F. A.; WU, G. Y. A review of methotrexate-associated hepatotoxicity. **Journal of Digestive Diseases**, v. 15, n. 10, p. 517-524, 2014.

BATISTA, F. L. A.; LIMA, L. M. G.; ABRANTE, I. A.; ARAÚJO, J. I. F.; BATISTA, F. L. A.; ABRANTE, I. A.; MAGALHÃES, E. A.; LIMA, D. R.; LIMA, M. C. L.; PRADO, B. S.; MOURA, L. F. W. G.; GUEDES, M. I. F.; FERREIRA, M. K.; MENEZES, J. E. S. A.; SANTOS, S. A. A. R.; MENDES, F. R. S.; MOREIRA, R. A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MAGALHÃES, F. E. A. M. Antinociceptive activity of ethanolic extract of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem, Meliaceae) fruit through opioid, glutamatergic and acid-sensitive ion pathways in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 408-416, 2018.

BASAKI, Y.; CHIKAHISA, L.; AOYAGI, K.; MIYADERA, K.; YONEKURA, K.; HASHIMOTO, A.; OKABE, S.; WIERZBA, K.; YAMADA, Y. γ -Hydroxybutyric acid and 5-fluorouracil, metabolites of UFT, inhibit the angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. **Angiogenesis**, v. 4, n. 3, p. 163-173, 2001.

BEHZADI, P.; BEHZADI, E.; RANJBAR, R. IL-12 family cytokines: General characteristics, pathogenic microorganisms, receptors, and signalling pathways. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 63, n. 1, p. 1-25, 2016.

BEIS, D.; STAINIER, D. Y. R. *In vivo* cell biology: following the zebrafish trend. **Trends in Cell Biology**, v. 16, n. 2, p. 105-112, 2006.

BELANGER, S. E.; RAWLINGS, J. M.; CARR, G. J. Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 8, p. 1768-1783, 2013.

BERRAONDO, P.; SANMAMED, M. F.; OCHOA, M. C.; ETXEBERRIA, I.; AZNAR, M. A.; PÉREZ-GRACIA, J. L.; RODRÍGUEZ-RUIZ, M. E.; PONZ-SARVISE, M.; CASTAÑON, E.; MELERO, I. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. **British Journal of Cancer**, p. 1, 2018.

BERTI, F. C. B.; PEREIRA, A. P. L.; CEBINELLI, G. C. M.; TRUGILO, K. P.; OLIVEIRA, K. B. The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 34, p. 1-13, 2017.

BEYDOGAN, A. B.; BOLKENT, S. The effects of silibin administration for different time periods on mouse liver with Ehrlich ascites carcinoma. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 3, p. 543-549, 2016.

BEZERRA, D. P.; CASTRO, F. O.; ALVEZ, A. P. N. N.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 6, p. 801-807, 2006.

BEZERRA, D. P.; CASTRO, F. O.; ALVEZ, A. P. N. N.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; ALENCAR, N. M. N.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology: An International Journal**, v. 28, n. 2, p. 156-163, 2008.

BHATTACHARYYA, A.; CHATTOPADHYAY, R.; MITRA, S.; CROWE, S. E. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 329-354, 2014.

BIGNOLD, L. P., **Principles of tumors: A translational approach to foundations**. Amsterdam: Elsevier, 2015.

BLAUW, L. L.; LI, Z.; RENSEN, S. S.; GREVE, J. W. M.; VERHOEVEN, A.; DERKS, R. J.; GIERA, M.; WANG, Y.; RENSEN, P. C. N. Metabolic liver inflammation in obesity does not robustly decrease hepatic and circulating CETP. **Atherosclerosis**, 2018.

BLOCH, N.; HAREL, D. The tumor as an organ: comprehensive spatial and temporal modeling of the tumor and its microenvironment. **BMC Bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 317, 2016.

BRANDÃO, E. M. **Efeito antineoplásico do extrato aquoso do *Plectranthus amboinicus* na forma ascítica do carcinoma de Ehrlich**. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

BRAUNBECK, T.; KAIS, B.; LAMMER, E.; OTTE, J.; SCHNEIDER, K.; STENGEL, D., STRECKER, R. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 21, p. 16247-16261, 2015.

BRAY, F.; JEMAL, A.; GREY, N.; FERLAY, J.; FORMAN, D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 8, p. 790-801, 2012.

BRITO, M.T. **Efeitos toxicológicos, antitumorais, antinociceptivos e anti-inflamatórios do metil 2-(3-metoxifenil)acetato, um análogo sintético do fenetil éster do ácido caféico (CAPE)**. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Área de concentração: Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

BRITO, M. T.; FERREIRA, R.C.; BELTRÃO, D. M.; MOURA, A. P. G.; XAVIER, A. L.; PITA, J. C. L. R.; BATISTA, T. M.; LONGATO, G. B.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; MEDEIROS, K. C. P.; SANTOS, S. G.; COSTA, V. C. O.; TAVARES, J. F.; DINIZ, M. F. F. M.; SOBRAL, M. V. Antitumor activity and toxicity of volatile oil from the leaves of *Annona leptopetala*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 5, p. 602-609, 2018.

BRUNDO, M.V; SALVAGGIO, A. Zebrafish or *Danio rerio*: A New Model in Nanotoxicology Study. In: BOZKURT, Y. **Recent Advances in Zebrafish Researches**. London: IntechOpen, p. 121 – 133, 2018.

BOSURGI, L.; CAO, Y. G.; CABEZA-CABRERIZO, M.; TUCCI, A.; HUGHES, L. D.; KONG, Y.; WEINSTEIN, J. S.; LICONA-LIMON, P.; SCHMID, E. T.; PELOROSSO, F.; GAGLIANI, N.; CRAFT, J. E.; FLAVELL, R. A.; GHOSH, S.; ROTHLIN, C. V. Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. **Science**, v. 356, n. 6342, p. 1072-1076, 2017.

CARDOSO, V.; VERMELHO, A. B; LIMA, C. A. R.; OLIVEIRA, J. M.; LIMA, M. E. F; SILVA, L. H. P.; DIREITO, G. M.; DANELLI, M. G. M. Antigenotoxic effect of piperine in broiler chickens intoxicated with aflatoxin B1. **Toxins**, v. 8, n. 11, p. 316, 2016.

CASTAÑEDA-GILL, J. M.; VISHWANATHA, J. K. Antiangiogenic mechanisms and factors in breast cancer treatment. **Journal of Carcinogenesis**, v. 15, 2016.

CALÌ, B.; MOLON, B.; VIOLA, A. Tuning cancer fate: the unremitting role of host immunity. **Open Biology**, v. 7, n. 4, p. 170006, 2017.

CALLAHAN, S. J.; CALLAHAN, S. J.; TEPAN, S.; ZHANG, Y. M.; LINDSAY, H.; BURGER, A.; CAMPBELL, N. R.; KIM, I. S.; HOLLMANN, T. J.; STUDER, L.; MOSIMANN, C.; WHITE, R. M. Cancer modeling by Transgene Electroporation in Adult Zebrafish (TEAZ). **Disease Models & Mechanisms**, v. 11, n. 9, p. dmm034561, 2018.

CANSIAN, R. L.; VANIN, A. B.; ORLANDO, T.; PIAZZA, S. P.; PUTON, B. M. S.; CARDOSO, R. I.; GONÇALVES, I. L.; HONAISER, T. C.; PAROUL N.; OLIVEIRA, D. Toxicity of clove essential oil and its ester eugenyl acetate against *Artemia salina*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 1, p. 155-161, 2017.

CHAKRABORTY, C.; SHARMA, A. R.; SHARMA, G.; LEE, S. Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 65, 2016.

CHAN, P. K. P.; HAYES, A. W. Acute toxicity and eye irritancy. In: HAYES, A. W.; KRUGER, C. L. **Hayes' Principles and Methods of Toxicology**. CRC Press, 2014. p. 1144-1199.

CHANDRAN, S. P.; NATARAJAN, S. B.; CHANDRASEHARAN, S. SHAHIMI, M. S. B. M. Nano drug delivery strategy of 5-fluorouracil for the treatment of colorectal cancer. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 2, p. 45-48, 2017.

CHARLTON, P.; SPICER, J. Targeted therapy in cancer. **Medicine**, v. 44, n. 1, p. 34-38, 2016.

CHAVARRIA, D.; SILVA, T.; SILVA, D. M.; REMIÃO, F.; BORGES, F. Lessons from black pepper: piperine and derivatives thereof. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 26, n. 2, p. 245-264, 2016.

CHEN, C.; LI, W.; QU, K.; CHEN, C. Piperine exerts anti-seizure effects via the TRPV1 receptor in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 714, n. 1-3, p. 288-294, 2013.

CHEN, F.; ZHUANG, X.; LIN, L.; YU, P.; WANG, Y.; SHI, Y.; HU, G.; SUN, YU. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 45, 2015.

CHEN, N.; WEI, F.; WANG, L.; CUI, S.; WAN, Y., LIU, S. Tumor necrosis factor alpha induces neural stem cell apoptosis through activating p38 MAPK pathway. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 11, p. 3052-3062, 2016a.

CHINTA, G.; SYED, S. B.; COUMAR, M. S.; PERIYASAMY, L. Piperine: A Comprehensive Review of Pre-Clinical and Clinical Investigations. **Current Bioactive Compounds**, v. 11, n. 3, p. 156-169, 2015.

CHOUDHARI, S. K.; SRIDHARAN, G.; GADBAIL, A.; POORNIMA, V. Nitric oxide and oral cancer: A review. **Oral Oncology**, v. 48, n. 6, p. 475-483, 2012.

CHOUDHARI, S. K.; CHAUDHARY, M.; BAGDE, S.; GADBAIL, A. R.; JOSHI, V. Nitric oxide and cancer: a review. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 11, n. 1, p. 118, 2013.

CHOUERI, T. K.; MOTZER, R. J. Systemic therapy for metastatic renal-cell carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 4, p. 354-366, 2017.

CHOY, W.N. Regulatory genetic toxicology tests. In: CHOY, W.N. **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. CRC Press, London, pp. 107–128, 2001.

CIOLLI, V.; GABRIELE, L.; SESTILI, P.; VARANO, F.; PROIETTI, E.; GRESSER, I.; TESTA, U.; MONTESORO, E.; BULGARINI, D.; MARIANI, G.; PESCHLE, C.; BELARDELLI, F. Combined interleukin 1/interleukin 2 therapy of mice injected with highly metastatic Friend leukemia cells: host antitumor mechanisms and marked effects on established metastases. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, n. 2, p. 313-322, 1991.

CIOMBOR, K. K.; WU, C.; GOLDBERG, R. M. Recent therapeutic advances in the treatment of colorectal cancer. **Annual Review of Medicine**, v. 66, p. 83-95, 2015.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CROMBIE, J.; LONGO, D.L. Principles of Cancer Treatment. In: HERRMANN, J. **Clinical Cardio-Oncology**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, p. 1 – 13, 2016.

CROXFORD, A. L.; KULIG, P.; BECHER, B. IL-12 and IL-23 in health and disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 4, p. 415-421, 2014.

CRUSZ, S. M.; BALKWILL, F. R. Inflammation and cancer: advances and new agents. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 10, p. 584, 2015.

COLOMBO, M.; P.; TRINCHIERI, G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 2, p. 155-168, 2002.

COZZOLINO, F.; TORCIA, M.; ALDINUCCI, D.; ZICHE, M.; ALMERIGOGNA, F.; BANI, D.; STERN, D.M. Interleukin 1 is an autocrine regulator of human endothelial cell growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 17, p. 6487-6491, 1990.

DAMALAS, D. E.; BLETSOU, A. A.; AGALOU, A.; BEIS, D.; THOMAIDIS, N. S. Assessment of the acute toxicity, uptake and biotransformation potential of benzotriazoles in zebrafish (*Danio rerio*) larvae combining HILIC-with RPLC-HRMS for high-throughput identification. **Environmental Science & Technology**, v. 52, n. 10, p. 6023-6031, 2018.

DATASUS. **Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH/SUS)/Plataforma DATASUS-NET**. Disponível em:

<tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sih/cnv/niuf.def> Acesso em fevereiro de 2019.

DEHNE, N.; TAUSENDSCHÖN, M.; ESSLER, S.; GEIS, T.; SCHMID, T.; BRÜNE, B. IL-4 reduces the proangiogenic capacity of macrophages by down-regulating HIF-1 α translation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 95, n. 1, p. 129-137, 2014.

DAVIDSON, W.; TELENI, L.; MULLER, J.; FERGUSON, M.; MCCARTHY, A. L.; VICK, J.; ISENRING, E. Malnutrition and chemotherapy-induced nausea and vomiting: implications for practice. **Oncology Nursing Forum**, v. 39, n. 4, p. E340-E345, 2012.

DEMARIA, M.; N. O'LEARY, M.; CHANG, J.; SHAO, L.; LIU, S.; ALIMIRAH, F.; KOENIG, K.; LE, C.; MITIN, N.; DEAL, A. M.; ALSTON, S.; ACADEMIA, E. C.; KILMARX, S.; VALDOVINOS, A.; WANG, B.; BRUIN, A.; KENNEDY, B. K.; MELOV, S.; ZHOU, D.; SHARPLESS, N. E.; MUSS, H.; CAMPISI, J. Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. **Cancer Discovery**, v. 7, n. 2, p. 165-176, 2017.

DEMBLA, V.; GROISBERG, R.; HESS, K.; FU, S.; WHELER, J.; HONG, D. S.; JANKU, F.; ZINNER, R.; PIHA-PAUL, S. A.; RAVI, V.; BENJAMIN, R. S.; PATEL, S.; SAMAIHA, N.; HERZOG, C. E.; KARP, D. D.; ROSZIK, J.; MERIC-BERNSTAM, F.; SUBBIAH, V. Outcomes of patients with sarcoma enrolled in clinical trials of pazopanib combined with histone deacetylase, mTOR, Her2, or MEK inhibitors. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15963, 2017.

DHARMARAJA, A. T. Role of reactive oxygen species (ROS) in therapeutics and drug resistance in cancer and bacteria. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 8, p. 3221-3240, 2017.

DHIVYA, V.; PRIYA, L. B.; CHIRAYIL, H. T.; SATHISKUMAR, S.; HUANG, C.; PADMA, V. V. Piperine modulates isoproterenol induced myocardial ischemia through antioxidant and anti-dyslipidemic effect in male Wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 705-713, 2017.

DICKENS, E.; AHMED, S. Principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery-Oxford International Edition**, v. 36, n. 3, p. 134-138, 2018.

DIETLEIN, F.; THELEN, L.; REINHARDT, H. C. Cancer-specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 8, p. 326-339, 2014.

DINARELLO, C. A. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 5, p. 1203-1217, 2011.

DO, M. T.; KIM, H. G.; CHOI, J. H.; KHANAL, T.; PARK, B. H.; TRAN, T. P.; JEONG, T. C.; JEONG, H. G. Antitumor efficacy of piperine in the treatment of human HER2-overexpressing breast cancer cells. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2591-2599, 2013.

DOĞANLI, C.; OXVIG, C.; LYKKE-HARTMANN, K. Zebrafish as a novel model to assess Na⁺/K⁺-ATPase-related neurological disorders. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 10, p. 2774-2787, 2013.

DOGRA, R. KS; KHANNA, S.; SHANKER, R. Immunotoxicological effects of piperine in mice. **Toxicology**, v. 196, n. 3, p. 229-236, 2004.

DOLAI, N., KARMAKAR, I., KUMAR, R. B. S., KAR, B., BALA, A.; HALDAR, P. K. Evaluation of antitumor activity and *in vivo* antioxidant status of *Anthocephalus cadamba* on Ehrlich ascites carcinoma treated mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 865-870, 2012.

DOUCETTE, C. D.; HILCHIE, A. L.; LIWSKI, R.; HOSKIN, D. W. Piperine, a dietary phytochemical, inhibits angiogenesis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 231-239, 2013.

EL-KENAWI, A. E.; EL-REMESSY, A. B. Angiogenesis inhibitors in cancer therapy: mechanistic perspective on classification and treatment rationales. **British journal of Pharmacology**, v. 170, n. 4, p. 712-729, 2013.

ELSHERBINY, N. M.; AL-GAYYAR, M. M. H. Anti-tumor activity of arjunolic acid against Ehrlich Ascites Carcinoma cells *in vivo* and *in vitro* through blocking TGF- β type 1 receptor. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p. 28-34, 2016.

FREIRE-DE-LIMA, L.; RIBEIRO, T. S.; ROCHA, G. M.; BRANDAO, B. A.; ROMEIRO, A.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J. O.; LIMA, M. E. F.; CARVALHO, T. M. U.; HEISE, N. The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms. **Parasitology Research**, v. 102, n. 5, p. 1059-1067, 2008.

ELKADY, A. A.; TAWFIK, S. S. Anti-inflammatory role of piperine against rat lung tissue damage induced by gamma-rays. **International Journal of Radiation Research**, v. 16, n. 1, p. 75-84, 2018.

ELLENBROEK, S. I.J; VAN RHEENEN, J. Imaging hallmarks of cancer in living mice. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 6, p. 406, 2014.

ELSHABRAWY, H. A.; CHEN, Z.; VOLIN, M. V.; RAVELLA, S.; VIRUPANNAVAR, S.; SHAHRARA, S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Angiogenesis**, v. 18, n. 4, p. 433-448, 2015.

FALCON, B. L.; CHINTHARLAPALLI, S.; UHLIK, M. T.; PYTOWSKIA, B. Antagonist antibodies to vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) as anti-angiogenic agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 164, p. 204-225, 2016.

FAN, Q., JING, Y.; YU, G.; KOU, X.; YE, F.; GAO, L.; LI, R.; ZHAO, Q.; YANG, Y.; LU, Z.; WEI, L. Tumor-associated macrophages promote cancer stem cell-like properties via transforming growth factor-beta1-induced epithelial–mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. **Cancer Letters**, v. 352, n. 2, p. 160-168, 2014.

FEITELSON, M. A.; ARZUMANYAN, A.; KULATHINAL, R. J.; BLAIN, S. W.; HOLCOMBE, R. F.; MAHAJNA, J.; MARINO, M.; MARTINEZ-CHANTAR, M. L.; NAWROTH, R.; SANCHEZ-GARCIA, I.; SHARMA, D.; SAXENA, N. K.; SINGH, N.; VLACHOSTERGIOS, P. J.; GUO, S.; HONOKI, K.; FUJII, H.; GEORGAKILAS, A. G.; NOWSHEEN, S. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. **Seminars in Cancer Biology**. Amsterdam: Elsevier, p. S25-S54, 2015.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084, 2007.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, 2015.

FERNANDES, A. L.; NASCIMENTO, J. P.; SANTOS, A. P.; FURTADO, C. A.; ROMANO, L. A.; ROSA, C. E.; MONSERRAT, J. M.; VENTURA-LIMA, J. Assessment of the effects of graphene exposure in *Danio rerio*: A molecular, biochemical and histological approach to investigating mechanisms of toxicity. **Chemosphere**, v. 210, p. 458-466, 2018.

FERNANDEZ, A. J.; FLAXMAN, N. A. Common laboratory tests, values, and interpretations. **Special Care in Dentistry**, v. 5, n. 6, p. 264-269, 1985.

FERNANDO, J.; JONES, R. The principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery-Oxford International Edition**, v. 33, n. 3, p. 131-135, 2015.

FERREIRA, C.; SOARES, D. C.; BARRETO-JUNIOR, C. B.; NASCIMENTO, M. T.; FREIRE-DE-LIMA, L.; DELORENZI, J. C.; LIMA, M. E. F.; ATELLA, G. C.; FOLLY, E.; CARVALHO, T. M. U.; SARAIVA, E. M.; PINTO-DA-SILVA, L. H. Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 17, p. 2155-2164, 2011.

FILOMENI, G.; DE ZIO, D.; CECCONI, F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 3, p. 377, 2015.

FITZMAURICE, C.; ALLEN, C.; BARBER, R. M.; BARREGARD, L.; BHUTTA, Z. A.; BRENNER, H. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. **JAMA Oncology**, v. 3, n. 4, p. 524-548, 2017.

FLOOR, S. L.; DUMONT, J. E.; MAENHAUT, C.; RASPE, E. Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time?. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 9, p. 509-515, 2012.

FORCADOS, G. E.; JAMES, D. B.; SALLAU, A. B.; MUHAMMAD, A.; MABETA, P. Oxidative stress and carcinogenesis: Potential of phytochemicals in breast cancer therapy. **Nutrition and Cancer**, v. 69, n. 3, p. 365-374, 2017.

FRERES, P.; JERUSALEM, G.; MOONEN, M. Categories of Anticancer Treatments. In: LANCELLOTTI, P.; ZAMORANO J. L.; GALDERISI, M. **Anti-Cancer Treatments and Cardiotoxicity: Mechanisms, Diagnostic and Therapeutic Interventions**. Amsterdam: Elsevier, p. 7 – 11, 2017.

FRIDMAN, W. H.; PAGÈS, F.; SAUTÈS-FRIDMAN, C.; GALON, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. nrc3245, 2012.

GABAY, C.; LAMACCHIA, C.; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 4, p. 232, 2010.

GABELOVA, A.; KOZICS, K.; KAPKA-SKRZYPCZAK, L.; KRUSZEWSKI, M.; SRAMKOVA, M. Nephrotoxicity: Topical issue. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 2018.

GAD, S. C. **Animal Models in Toxicology**. 2 ed. Flórida: CRC Press, 2007.

GAJSKI, G.; GERIĆ, M.; DOMIJAN, A.; GARAJ-VRHOVAC, V. Combined cyto/genotoxic activity of a selected antineoplastic drug mixture in human circulating blood cells. **Chemosphere**, v. 165, p. 529-538, 2016.

GALADARI, S.; RAHMAN, A.; PALLICHANKANDY, S.; THAYYULLATHIL, F. Reactive oxygen species and cancer paradox: to promote or to suppress?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 104, p. 144-164, 2017.

GAO, X. P.; FENG, F.; ZHANG, X. Q.; LIU, X. X.; WANG, Y. B.; SHE, J. X.; HE, Z. H.; HE, M. F. Toxicity assessment of 7 anticancer compounds in zebrafish. **International Journal of Toxicology**, v. 33, p. 98-105, 2014.

GEORGAKOPOULOU, E.; STEBBING, J.; SCULLY, C. Targeted cancer therapies: Oral health care implications. **The Journal of the American Dental Association**, v. 149, p. 100-111, 2018.

GILL, J. G.; PISKOUNOVA, E.; MORRISON, S. J. Cancer, oxidative stress, and metastasis. In: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, p. 163-175, 2016.

GRANOT, Z.; HENKE, E.; COMEN, E. A.; KING, T. A.; NORTON, L.; BENEZRA, R. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. **Cancer Cell**, v. 20, n. 3, p. 300-314, 2011.

GREENSHIELDS, A. L.; DOUCETTE, C. D.; SUTTON, K. M.; MADERA, L.; ANNAN, H.; YAFFE, P. B. KNICKLE, A. F.; DONG, Z.; HOSKIN, D. W. Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. **Cancer Letters**, v. 357, n. 1, p. 129-140, 2015.

GRINEVICIUS, V. M. A. S.; KVICINSKI, M. R.; MOTA, N. S. R. S.; OURIQUE, F.; CASTRO, L. S. E. P. W.; ANDREGUETTI, R. R.; CORREIA, J. F. G.; FILHO, D. W.; PICH, C. T.; PEDROSA, R. C. *Piper nigrum* ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction, oxidative damage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 189, p. 139-147, 2016.

GRUMOLATO, L.; AARONSON, S.A. Oncogenes and Signal Transduction. In: MENDELSON, J. et al. **The Molecular Basis of Cancer**. 4. ed, Amsterdam: Elsevier, 2015.

GRUNEWALD, T.; LEDERMANN, J. A. Targeted therapies for ovarian cancer. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 41, p. 139-152, 2017.

GOEL, S.; DUDA, D. G.; XU, L.; MUNN, L. L.; BOUCHER, Y.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 3, p. 1071-1121, 2011.

GOEL, H.; MERCURIO, A. M. VEGF targets the tumour cell. **Nature Reviews cancer**, v. 13, n. 12, p. 871, 2013.

GOMES, A. S.; RAMOS, H.; SOARES, J.; SARAIVA, L. p53 and glucose metabolism: an orchestra to be directed in cancer therapy. **Pharmacological Research**, 2018.

GOSWAMI, K. K.; GHOSH, T.; GHOSH, S.; SARKAR, M.; BOSE, A.; BARAL, R. Tumor promoting role of anti-tumor macrophages in tumor microenvironment. **Cellular immunology**, v. 316, p. 1-10, 2017.

GUERRA, M. R.; BUSTAMANTE-TEIXEIRA, M. T.; CORRÊA, C. S. L.; ABREU, D. M. X. D.; CURADO, M. P.; MOONEY, M.; NAGHAVI, M.; TEIXEIRA, R.; FRANÇA, E. B.; MALTA, D. C. Magnitude e variação da carga da mortalidade por câncer no Brasil e Unidades da Federação, 1990 e 2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 20, n. 1, p. 102-115, 2017.

GUINOVART, T.; HERNÁNDEZ-ALONSO, D.; ADRIAENSSENS, L.; BLONDEAU, P.; RIUS, F. X.; BALLESTER, P.; ANDRADE, F. J. Characterization of a new ionophore-based ion-selective electrode for the potentiometric determination of creatinine in urine. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 587-592, 2017.

GUNASEKARAN, V.; ELANGO, K.; DEVARAJ, S. N. Targeting hepatocellular carcinoma with piperine by radical-mediated mitochondrial pathway of apoptosis: an *in vitro* and *in vivo* study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 106-118, 2017.

GURGEL, A. P. A. D.; SILVA, J. G.; GRANGEIRO, A. R. S.; OLIVEIRA, D. C.; LIMA, C. M. P.; SILVA, A. C. P.; OLIVEIRA, R. A. G.; SOUZA, I. A. *In vivo* study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, n. 2, p. 361-363, 2009.

GUTKIN, D.W.; SHURIN, M.R. Tumor-infiltrating immune cells of myeloid origin. In: Butterfield, L.H.; KAUFMAN, H.L.; MARINCOLA, F.M. **Cancer Immunotherapy Principles and Practice**. 1. ed. New York, 2017.

GUTSCHNER, T; DIEDERICH, S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. **RNA Biology**, v. 9, n. 6, p. 703-719, 2012.

GÜMÜŞHAN, H.; MUSA, D. Effect of adriamycin administered via different routes on Ehrlich ascites tumor cells. **European Journal of Biology**, v. 67, n. 1, p. 49-54, 2008.

HALE, S. E.; ŠKULCOVÁ, L.; PÍPAL, M.; CORNELISSEN, G.; OEN, A. M. P.; EEK, E.; BIELSKÁ, L. Monitoring wastewater discharge from the oil and gas industry using passive sampling and *Danio rerio* bioassay as complimentary tools. **Chemosphere**, v. 216, p. 404-412, 2019.

HAN, S.; LIU, H.; YANG, L.; CUI, L. XU, Y. Piperine (PP) enhanced mitomycin-C (MMC) therapy of human cervical cancer through suppressing Bcl-2 signaling pathway via inactivating STAT3/NF- κ B. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1403-1410, 2017.

HANAHAN, D; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, D. Rethinking the war on cancer. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 558-563, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBER, R. A. Hallmarks of cancer. An organizing principle for cancer medicine. Cancer: **Principles & Practice of Oncology**, v. 10, 2015.

HARRIS A.L., GENERALI, D. Inhibitors of Tumor Angiogenesis. In: NEIDLE, S. **Cancer Drug Design and Discovery**. Amsterdam: Elsevier, p. 275 – 317, 2014.

HARVEY, R. D.; MORGAN, E. T. Cancer, Inflammation, and Therapy: Effects on Cytochrome P450—Mediated Drug Metabolism and Implications for Novel Immunotherapeutic Agents. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 4, p. 449-457, 2014.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, n. 1, p. 53-58, 1989.

HAVELL, E. A.; FIER, W.; NORTH, R. J. The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF), I. Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, n. 3, p. 1067-1085, 1988.

HAYASHI, M. The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—. **Genes and Environment**, v. 38, n. 1, p. 18, 2016.

HILL, D.; CHEN, L.; SNAAR-JAGALSKA, E.; CHAUDHRY, B. Embryonic zebrafish xenograft assay of human cancer metastasis. **F1000Research**, v. 7, 2018.

HINTZSCHE, H.; HEMMANN, U.; POTH, A.; UTESCH, D.; LOTT, J.; STOPPER, H. Fate of micronuclei and micronucleated cells. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 771, p. 85-98, 2017.

HO, M.; TANG, S.; CHUANG, M.; CHA, T.; LI, J.; SUN., G.; SUN, K. TNF- α induces epithelial–mesenchymal transition of renal cell carcinoma cells via a GSK3 β -dependent mechanism. **Molecular Cancer Research**, 2012.

HOJJAT-FARSANGI, M. Small-molecule inhibitors of the receptor tyrosine kinases: promising tools for targeted cancer therapies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 8, p. 13768-13801, 2014.

HONG, S.; QIAN, J.; YANG, J.; LI, H.; KWAK, L. W.; YI, Q. Roles of idiotype-specific t cells in myeloma cell growth and survival: Th1 and CTL cells are tumoricidal while Th2 cells promote tumor growth. **Cancer Research**, v. 68, n. 20, p. 8456-8464, 2008.

HU, M.; YUAN, X.; LIU, Y.; TANG, S.; MIAO, J.; ZHOU, Q.; CHEN, S. IL-1 β -induced NF- κ B activation down-regulates miR-506 expression to promotes osteosarcoma cell growth through JAG1. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 1147-1155, 2017.

HUANG, J.; ZHANG, T.; HAN, S.; CAO, J.; CHEN, Q.; WANG, S. The inhibitory effect of piperine from *Fructus piperis* extract on the degranulation of RBL-2H3 cells. **Fitoterapia**, v. 99, p. 218-226, 2014.

HUANG, Y.; ZHANG, Z.; HU, B. Bifurcation for a free-boundary tumor model with angiogenesis. **Nonlinear Analysis: Real World Applications**, v. 35, p. 483-502, 2017.

HUGO, S. E.; SCHLEGEL, A. A genetic screen for zebrafish mutants with hepatic steatosis identifies a locus required for larval growth. **Journal of Anatomy**, v. 230, n. 3, p. 407-413, 2017.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Rio de Janeiro: INCA, 2018. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>.

ISSA, N. M.; MANSOUR, F. K.; EL-SAFTI, F. A.; NOOH, H. Z.; EL-SAYED, I. H. Effect of *Balanites aegyptiaca* on Ehrlich Ascitic carcinoma growth and metastasis in Swiss mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 67, n. 9, p. 435-441, 2015.

ITO, S.; SHIROTA, H.; KASAHARA, Y.; SAIJO, K.; ISHIOKA, C. IL-4 blockade alters the tumor microenvironment and augments the response to cancer immunotherapy in

a mouse model. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 66, n. 11, p. 1485-1496, 2017.

IYAMA, T.; WILSON, D. M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **DNA Repair**, v. 12, n. 8, p. 620-636, 2013.

JAGANATHAN, S. K.; MONDHE, D.; WANI, Z. A.; PAL, H. C.; MANDAL, M. Effect of honey and eugenol on Ehrlich ascites and solid carcinoma. **BioMed Research International**, v. 2010, 2010.

JATTO, J.; OBOH, E.; NTEKIM, A. 5-Fluorouracil Induced Cardiotoxicity in a Young Patient with Colon Cancer: An Unusual Finding. **Journal of Oncology Research and Therapy**, v. 10, 2017.

JAYSON, G. C.; KERBEL, R.; ELLIS, L.M.; HARRIS, A. L. Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. **The Lancet**, v. 388, n. 10043, p. 518-529, 2016.

JESUS, A. A.; GOLDBACH-MANSKY, R. IL-1 blockade in autoinflammatory syndromes. **Annual Review of Medicine**, v. 65, p. 223-244, 2014.

JIA, S. F.; KLEINERMAN, E. S. Antitumor activity of TNF-alpha, IL-1, and IFN-gamma against three human osteosarcoma cell lines. **Lymphokine and Cytokine Research**, v. 10, n. 4, p. 281-284, 1991.

JIMÉNEZ-VALERIO, G.; CASANOVAS, O. Angiogenesis and metabolism: entwined for therapy resistance. **Trends in Cancer**, v. 3, n. 1, p. 10-18, 2017.

JOHNSON, K. E.; WILGUS, T. A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the regulation of cutaneous wound repair. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 10, p. 647-661, 2014.

JOHNSON, Z. I.; SCHOEPLIN, Z. R.; CHOI, H.; SHAPIRO, I. M.; RISBUD, M. V. Disc in flames: Roles of TNF- α and IL-1 β in intervertebral disc degeneration. **European Cells & Materials**, v. 30, p. 104, 2015.

JOSEPHS, S. F.; ICHIM, T. E.; PRINCE, S. M.; KESARI, S.; MARINCOLA, F. M.; ESCOBEDO, A. R.; JAFRI, A. Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic. **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 1, p. 242, 2018.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

JUNTILA, M. R.; SAUVAGE, F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 346, 2013.

KABEER, F. A.; RAJALEKSHMI, D. S.; NAIR, M. S.; PRATHAPAN, R. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of deoxyelephantopin from a potential medicinal plant *Elephantopus scaber* against Ehrlich ascites carcinoma. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 101106, 2019.

KALBASI, A.; KOMAR, C.; TOOKER, G. M.; LIU, M.; LEE, J. W.; GLADNEY, W. L.; BEN-JOSEF, E.; BEATTY, G. L. Tumor-derived CCL2 mediates resistance to radiotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 1, p. 137-148, 2017.

KAREKAR, V. R.; MUJUMDAR, A. M.; JOSHI, S. S.; DHULEY, J.; SHINDE, S. L.; GHASKADBI, S. Assessment of genotoxic effect of piperine using *Salmonella typhimurium* and somatic and somatic and germ cells of Swiss albino mice. **Arzneimittel-Forschung**, v. 46, n. 10, p. 972-975, 1996.

KANG, H.; ROSENWAKS, Z. P53 and reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 109, n. 1, p. 39-43, 2018.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 155-176, 2016.

KE, X.; SHEN, L. Molecular targeted therapy of cancer: The progress and future prospect. **Frontiers in Laboratory Medicine**, v. 1, n. 2, p. 69-75, 2017.

KEYEL, P. A. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. **Cytokine**, v. 69, n. 1, p. 136-145, 2014.

KHAN, A. Q.; KUTTIKRISHNAN, S.; SIVEEN, K. S.; PRABHU, K. S.; SHANMUGAKONAR, M.; AL-NAEMI, H.; HARIS, M.; DERMIME, S.; UDDIN, S. RAS-mediated oncogenic signaling pathways in human malignancies. **Seminars in cancer biology**, 2018.

KIM, J. J.; LEE, S. B.; PARK, J.K.; YOO, Y. D. TNF- α -induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-X L. **Cell Death and Differentiation**, v. 17, n. 9, p. 1420, 2010.

KIM, J.; MIRANDO, A. C.; POPEL, A. S.; GREEN, J. J. Gene delivery nanoparticles to modulate angiogenesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 119, p. 20-43, 2017.

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

KINGHORN, A. D.; PAN, L.; FLETCHER, J. N.; CHAI, H. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 6, p. 1539-1555, 2011.

KIRSCH-VOLDERS, M.; PLAS, G.; ELHAJOUJI, A.; LUKAMOWICZ, M. GONZALEZ, L.; LOOCK, K. V.; DECORDIER, I. The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 8, p. 873-899, 2011.

KLAUNIG, J. E.; XU, Y.; ISENBERG, J. S.; BACHOWSKI, S.; KOLAJA, K. L.; JIANG, J.; STEVENSON, D. E.; JUNIOR, E. F. W. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. suppl 1, p. 289-295, 1998.

KLEIN, G. Comparative studies of mouse tumors with respect to their capacity for growth as "ascites tumors" and their average nucleic acid content per cell. **Experimental Cell Research**, v. 2, n. 3, p. 518-573, 1951.

KOEHLER, D.; WILLIAMS, F. E. Utilizing zebrafish and okadaic acid to study Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 9, p. 1538, 2018.

KOENE, R. J.; PRIZMENT, A. E.; BLAES, A.; KONETY, S. H. Shared risk factors in cardiovascular disease and cancer. **Circulation**, v. 133, n. 11, p. 1104-1114, 2016.

KOLLER, F. L.; HWANG, D. G.; DOZIER, E. A.; FINGLETON, B. Epithelial interleukin-4 receptor expression promotes colon tumor growth. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 6, p. 1010-1017, 2010.

KUMAR, N.; DHAMIJA, I.; RAJ, P. V.; JAYASHREE, B. S.; PARIHAR, V.; MANJULA, S. N.; THOMAS, S.; KUTTY, N. G.; RAO, C. M. Preliminary investigation of cytotoxic potential of 2-quinolone derivatives using *in vitro* and *in vivo* (solid tumor and liquid tumor) models of cancer. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 409-417, 2014.

KUMAR, A.; SASMAL, D.; SHARMA, N. Immunomodulatory role of piperine in deltamethrin induced thymic apoptosis and altered immune functions. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 504-514, 2015.

KUMAR, D.; SHARMA, S.; VERMA, S.; KUMAR, P.; AMBASTA, R. K. Molecular signalling saga in tumour biology. **Journal of Tumor**, v. 3, n. 2, p. 309-313, 2015.

LABOISSONNIERE, L. A.; SMITH, C. L.; MESENBRINK J.; CHOWDHURY, R.; BURNEY A.; LANG, M.; SIERRA, M.; STARK, A.; MALDONADO-CASALDUC, G.; MULLER, M.; TRIMARCHI, J. M. ALS-associated genes display CNS expression in the developing zebrafish. **Gene Expression Patterns**, v. 30, p. 14-31, 2018.

LAI, L.; FU, Q.; LIU, Y.; JIANG, K.; GUO, Q.; CHEN, Q.; YAN, B.; WANG, Q.; SHEN, J. Piperine suppresses tumor growth and metastasis *in vitro* and *in vivo* in a 4T1 murine breast cancer model. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 4, p. 523, 2012.

LANDGRAF, K.; SCHUSTER, S.; MEUSEL, A.; GARTEN, A.; RIEMER, T.; SCHLEINITZ, D.; KIESS, W.; KÖRNER, A. Short-term overfeeding of zebrafish with normal or high-fat diet as a model for the development of metabolically healthy versus unhealthy obesity. **BMC Physiology**, v. 17, n. 1, p. 4, 2017.

LASEK, W.; ZAGOŹDŹON, R.; JAKOBISIAK, M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy?. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 63, n. 5, p. 419-435, 2014.

LAVENDER, N.; YANG, J.; CHEN, S.; SAI, J.; JOHNSON, C. A.; OWENS, P.; AYERS, G. D.; RICHMOND, A. The Yin/Yan of CCL2: a minor role in neutrophil anti-tumor activity *in vitro* but a major role on the outgrowth of metastatic breast cancer lesions in the lung *in vivo*. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 88, 2017.

LEE, I. Y.; KIM, J.; KO, E.; JEOUNG, E. J.; KWON, Y.; CHOE, J. Interleukin-4 inhibits the vascular endothelial growth factor-and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis *in vitro*. **Molecules and Cells**, v. 14, n. 1, p. 115-121, 2002.

LEE, H. Y.; BARBER, C.; ROGERS, J. A.; MINERICK, A. R. Electrochemical hematocrit determination in a direct current microfluidic device. **Electrophoresis**, v. 36, n. 7-8, p. 978-985, 2015.

LEE, H. L.; PARK, M. H.; SONG, J. K.; JUNG, Y. Y.; KIM, Y.; KIM, K. B.; HWANG, D. Y.; YOON, D. Y.; SONG, M. J.; HAN, S. B.; HONG, J. T. Tumor growth suppressive effect of IL-4 through p21-mediated activation of STAT6 in IL-4R α overexpressed melanoma models. **Oncotarget**, v. 7, n. 17, p. 23425, 2016a.

LEE, B.; KWON, B.; HONG, E.; SHIM, A.; SONG, J.; KIM, H.; CHANG, S.; KIM, Y.; KWEON, M.; YOUN, J.; KO, H. Interleukin-10 attenuates tumour growth by inhibiting interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 signalling in myeloid-derived suppressor cells. **Cancer Letters**, v. 381, n. 1, p. 156-164, 2016b.

LEKSKULCHAI, V. Quantitation of anticancer drugs-Cyclophosphamide and Ifosfamide in urine and water sewage samples by gas chromatography-mass spectrometry. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 29, n. 5, p. 815, 2016.

LI, Z.; CHEN, L.; QIN, Z. Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 6, n. 6, p. 415, 2009.

LI, R.; JIA, Z.; TRUSH, M. A. Defining ROS in biology and medicine. **Reactive Oxygen Species (Apex, NC)**, v. 1, n. 1, p. 9, 2016.

LI, G.; ZHENG, J.; XU, B.; LING, J.; QIU, W.; WANG, Y. Simvastatin inhibits tumor angiogenesis in HER2-overexpressing human colorectal cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 85, p. 418-424, 2017.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells?. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 211-218, 2016.

LIM, S. Y.; YUZHALLIN, A. E.; GORDON-WEEKS, A. N.; MUSCHEL, R. J. Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. **Oncotarget**, v. 7, n. 19, p. 28697, 2016.

LINCH, M.; CLAUS, J.; BENSON, C. Update on imatinib for gastrointestinal stromal tumors: duration of treatment. **OncoTargets and Therapy**, v. 6, p. 1011, 2013.

LIU, Y.; CHANG, Y.; YANG, C.; SANG, Z.; YANG, T.; ANG, W.; YE, W.; WEI, Y.; GONG, C.; LUO, Y. Biodegradable nanoassemblies of piperlongumine display

enhanced anti-angiogenesis and anti-tumor activities. **Nanoscale**, v. 6, n. 8, p. 4325-4337, 2014.

LIU, Y.; YIN, T.; FENG, Y.; CONA, M. M.; HUANG, G.; LIU, J.; SONG, S.; JIANG, Y.; XIA, Q.; SWINNEN, J. V.; BORMANS, G.; HIMMELREICH, U.; OYEN, R.; NI, Y. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**, v. 5, n. 5, p. 708, 2015.

LIU, J.; WANG, Z. Increased oxidative stress as a selective anticancer therapy. **Oxidative Medicine and Cellular longevity**, v. 2015, 2015.

LIPPITZ, B. E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. **The Lancet Oncology**, v. 14, n. 6, p. e218-e228, 2013.

LOCASALE, J. W.; CANTLEY, L. C. Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 4, p. 443-451, 2011.

LONG, K. B.; GLADNEY, W. L.; TOOKER, G. M.; GRAHAM, K.; FRAIETTA, J. A.; BEATTY, G. L. IFN γ and CCL2 cooperate to redirect tumor-infiltrating monocytes to degrade fibrosis and enhance chemotherapy efficacy in pancreatic carcinoma. **Cancer Discovery**, 2016.

LÓPEZ, A. G.; SEOANE, J. M.; ASANJUÁN, M. A. F. Dynamics of the cell-mediated immune response to tumour growth. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 375, n. 2096, p. 20160291, 2017.

LUKENS, J. R.; GROSS, J. M.; KANNEGANTI, T. IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 315, 2012.

LUZINA, I. G.; KEEGAN, A. D.; HELLER, N. M.; ROOK, G. A. W.; SHEA-DONOHUE, T.; ATAMAS, S. P. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 4, p. 753-764, 2012.

MA, J.; LIU, H.; WANG, X.. Effect of ginseng polysaccharides and dendritic cells on the balance of Th1/Th2 T helper cells in patients with non-small cell lung cancer. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 34, n. 6, p. 641-645, 2014.

MACHERET, M; HALAZONETIS, T. D. DNA replication stress as a hallmark of cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 10, p. 425-448, 2015.

MAEDA, A.; SHIRAO, T.; SHIRASAYA, D.; YOSHIOKA, Y.; YAMASHITA, Y.; AKAGAWA, M.; ASHIDA, H. Piperine Promotes Glucose Uptake Through ROS-Dependent Activation of the CAMKK/AMPK Signaling Pathway in Skeletal Muscle. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, n. 11, p. 1800086, 2018.

MAHINY, A. J.; KARIKO, K. Measuring hematocrit in mice injected with in vitro-transcribed erythropoietin mRNA. In: RHOADS, R. E. **Synthetic mRNA**. Humana Press, New York, NY, p. 297-306, 2016.

MAI, W.; LU, D.; LIU, X.; CHEN, L. MCP-1 produced by keratinocytes is associated with leucocyte recruitment during elicitation of nickel-induced occupational allergic contact dermatitis. **Toxicology and Industrial Health**, v. 34, n. 1, p. 36-43, 2018.

MAINO, E.; SANCETTA, R.; VIERO, P.; IMBERGAMO, S.; SCATTOLIN, A. M.; VESPIGNANI, M.; BASSAN, R. Current and future management of Ph/BCR-ABL positive ALL. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 14, n. 6, p. 723-740, 2014.

MAJ, E.; PAPIERNIK, D.; WIETRZYK, J. Antiangiogenic cancer treatment: The great discovery and greater complexity. **International Journal of Oncology**, v. 49, n. 5, p. 1773-1784, 2016.

MANNINO, M. H.; ZHU, Z.; XIAO, H.; BAI, Q.; WAKEFIELD, M. R. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer Letters**, v. 367, n. 2, p. 103-107, 2015.

MAOLAKE, A.; IZUMI, K.; SHIGEHARA, K.; NATSAGDORJ, A.; IWAMOTO, H.; KADOMOTO, S.; TAKEZAWA, Y.; MACHIOTA, K.; NARIMOTO, K.; NAMIKI, M.; LIN, W.; WUFUER, G.; MIZOKAMI, A. Tumor-associated macrophages promote prostate cancer migration through activation of the CCL22–CCR4 axis. **Oncotarget**, v. 8, n. 6, p. 9739, 2017.

MARACLE, C. X.; TAS, S. W. Inhibitors of angiogenesis: ready for prime time?. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 28, n. 4, p. 637-649, 2014.

MACIEL, M. A. M.; GOMES, F. E. S.; PINTO, A. C.; CÓLUS, I. M. S.; MAGALHÃES, N. S. S.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Aspectos sobre produtos naturais na descoberta de novos agentes antitumorais e antimutagênicos, **Revista Fitos**, v. 3, p. 38 – 59, 2007.

MARTINS, D.; SANTOS, J. F.; LOBÃO, M.; SOARES, C.; UZAM, P. P. Manipulação de quimioterápicos pelos profissionais da saúde. **Revista da Universidade Ibirapuera**, v. 10, 2016.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000prime Reports**, v. 6, 2014.

MARUYAMA, H.; KONDO, T.; SEKIMOTO, T.; YOKOSUKA, O. Differential clinical impact of ascites in cirrhosis and idiopathic portal hypertension. **Medicine**, v. 94, n. 26, 2015.

MEHMET, O.; ISIK, D. K.; IBRAHIM, H. K.; MUHAMMED, E. G. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2375-2378, 2011.

MEGHWAL, M.; GOSWAMI, T. K. *Piper nigrum* and piperine: an update. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 8, p. 1121-1130, 2013.

MEURETTE, O.; MEHLEN, P. Notch signaling in the tumor microenvironment. **Cancer Cell**, 2018.

MIKAMI, S.; MIZUNO, R.; KOSAKA, T.; SAYA, H.; OYA, M.; OKADA, Y. Expression of TNF- α and CD 44 is implicated in poor prognosis, cancer cell invasion, metastasis and resistance to the sunitinib treatment in clear cell renal cell carcinomas.

International Journal of Cancer, v. 136, n. 7, p. 1504-1514, 2015.

MILLER, K. D.; SIEGEL, R. L.; LIN, C. C.; MARIOTTO, A. B.; KRAMER, J. L.; ROWLAND, J. H.; STEIN, K. D.; ALTERI, R.; JEMAL, A. Cancer treatment and survivorship statistics. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 4, p. 271-289, 2016.

MISHRA, R.; KOVALSKA, J.; JANDA, J.; VANNUCCI, L.; RAJMON, R.; HORAK, V. Tumor Progression Is Associated with Increasing CD11b+ Cells and CCL2 in Lewis Rat Sarcoma. **Anticancer Research**, v. 35, n. 2, p. 703-711, 2015.

MISHRA, S.; TAMTA, A. K.; SARIKHANI, M.; DESINGU, P. A.; KIZKEKRA S. M.; PANDIT A. S.; KUMAR, S.; KHAN, D.; RAGHAVAN, S. C.; SUNDARESAN, N. R. Subcutaneous Ehrlich Ascites Carcinoma mice model for studying cancer-induced cardiomyopathy. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5599, 2018.

MOLLAZADEH, H.; CICERO, A. F. G.; BLESSO, C. N.; PIRRO, M.; MAJEED, M.; SAHEBKAR, A. Immune modulation by curcumin: The role of interleukin-10. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-13, 2017.

MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Amsterdam: Elsevier, p. 50-64, 2018.

MOORE, K. W.; MALEFYT, R. W.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 683-765, 2001.

MOURA, A. P. G.; BELTRÃO, D. M.; PITA, J. C. L. R.; XAVIER, A. L.; BRITO, M. T.; SOUSA, T. K. G. D.; BATISTA, L. M.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; TORRE, A. D.; DUARTE, M. C.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; SOBRAL, M. V. Essential oil from fruit of *Xylopia langsdorffiana*: antitumour activity and toxicity. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 3093-3102, 2016.

MOUSA, S. A.; DAVIS, P. J. Angiogenesis and anti-angiogenesis strategies in cancer. In: MOUSA, S. A.; DAVIS, P. J. **Anti-Angiogenesis Strategies in Cancer Therapeutics**. Amsterdam: Elsevier, p. 1 – 19, 2017.

MURPHY, P. A.; BEGUM, S.; HYNES, R. O. Tumor angiogenesis in the absence of fibronectin or its cognate integrin receptors. **PLoSOne**, v. 10, n. 3, p. e0120872, 2015.

MUMM, J. B.; EMMERICH, J.; ZHANG, X.; CHAN, I.; WU, L.; MAUZE, S.; BLAISDELL, S.; BASHAM, B.; DAI, J.; GREIN, J.; SHEPPARD, C.; HONG, K.; CUTLER, C.; TURNER, S.; LAFACE, D.; KLEINSCHKE, M.; JUDO, M.; AYANOGLU, G.; LANGOWSKI, J.; GU, D.; PAPORELLO, B.; MURPHY, E.; SRIRAM, V.; NARAVULA, S.; DESAI, B.; MEDICHERLA, S.; SEGHEZZI, W.; MCCLANAHAN, T.;

CANNON-CARLSON, S.; BEEBE, A. M.; OFT, M. IL-10 elicits IFN γ -dependent tumor immune surveillance. **Cancer Cell**, v. 20, n. 6, p. 781-796, 2011.

MÜNZEL, T.; GORI, T.; JUNIOR, J. F. K.; MAACK, C.; DAIBER, A. Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. **European Heart Journal**, v. 36, n. 38, p. 2555-2564, 2015.

NAGARAJAN, A.; MALVI, P.; WAJAPYEE, N. Oncogene-directed alterations in cancer cell metabolism. **Trends in Cancer**, v. 2, n. 7, p. 365-377, 2016.

NARASIMHAMURTHY, K. Lack of genotoxic effects of piperine, (the active principle of black pepper) in albino mice. **Journal of Food Safety**, v. 11, n. 1, p. 39-48, 1990.

NASCIMENTO, J. E. T.; MORAIS, S. M.; LISBOA, D. S.; SOUSA, M. O.; SANTOS, S. A. A. R. S.; MAGALHÃES, F. E. A.; CAMPOS, A. R. The orofacial antinociceptive effect of Kaempferol-3-O-rutinoside, isolated from the plant *Ouratea fieldingiana*, on adult zebrafish (*Danio rerio*). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, p. 1030-1036, 2018.

NETEA, M. G.; SIMON, A.; VEERDONK, F. V.; KULLBERG, B.; MEER, J. W. M. V.; JOOSTEN, L. A. B. IL-1 β processing in host defense: beyond the inflammasomes. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 2, p. e1000661, 2010.

NITULESCU, G. M.; MARGINA, D.; JUZENAS, P.; PENG, Q.; OLARU, O. T.; SALOUSTROS, E.; FENGA, C.; SPANDIDOS, D. A.; LIBRA, M.; TSATSAKIS, A. M. Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use. **International Journal of Oncology**, v. 48, n. 3, p. 869-885, 2016.

NOURAZARIAN, A. R.; KANGARI, P.; SALMANINEJAD, A. Roles of oxidative stress in the development and progression of breast cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 12, p. 4745-51, 2014.

OECD. **Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**. OECD Guideline for testing of chemicals n. 474. Paris: OECD Publishing, 1997.

OECD. **Acute Oral Toxicity**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals n. 423. Paris: OECD Publishing, 2001.

OECD. **Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals n. 236. Paris: OECD Publishing, 2013.

OESER, K.; MAXEINER, J.; SYMOWSKI, C.; STASSEM, M.; VOEHRINGER, D. T cells are the critical source of IL-4/IL-13 in a mouse model of allergic asthma. **Allergy**, v. 70, n. 11, p. 1440-1449, 2015.

OHKURA, M.; FUCHIMOTO, S.; ORITA, K. Antitumor Effect of Recombinant Human Interleukin-1 β Alone and in Combination with Natural Human Tumor Necrosis Factor- α . **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 81, n. 10, p. 1026-1031, 1990.

OJEHOMON, M.; ALDERMAN, S. L.; SANDHU, L.; SUTCLIFFE, S.; RAAY, T. V.; GILLIS, T. E.; DAWSON, J. F. Identification of the *actc1c* cardiac actin gene in zebrafish. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, 2018.

OUYANG, D.; ZENG, L.; PAN, H.; XU, L.; WANG, Y.; LIU, K.; HE, X. Piperine inhibits the proliferation of human prostate cancer cells via induction of cell cycle arrest and autophagy. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 424-430, 2013.

OZASLAN, M.; KARAGOZ, I. D.; KILIC, I. H.; GULDUR, M. E. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2375-2378, 2011.

PAARAKH, P. M.; SREERAM, D. C.; GANAPATHY, S. S. D.; GANAPATHY, S. P. S. *In vitro* cytotoxic and *in silico* activity of piperine isolated from *Piper nigrum* fruits Linn. **In silico Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 9, 2015.

PAGLIARONE, S.; FRATTONE, L.; PIROCCHI, V.; DELLA SALDA, L.; PALMIERI, C. Altered expression of p53, but not Rb, is involved in canine prostatic carcinogenesis. **Research in Veterinary Science**, v. 105, p. 195-199, 2016.

PAUL, W. E.; ZHU, J. How are T_H2-type immune responses initiated and amplified?. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 4, p. 225, 2010.

PAULA, V. F.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; PILÓ-VELOSO, D.; PICANÇO, M. C. Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine. **Pest Management Science**, v. 56, n. 2, p. 168-174, 2000.

PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. The emerging hallmarks of cancer metabolism. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 1, p. 27-47, 2016.

PELLY, V. S.; KANNAN, Y.; COOMES, S. M.; ENTWISTLE, L. J.; RÜCKERL, D.; SEDDON, B.; MACDONALD, A. S.; MCKENZIE, A.; WILSON, M. S. IL-4-producing ILC2s are required for the differentiation of T_H2 cells following *Heligmosomoides polygyrus* infection. **Mucosal Immunology**, v. 9, n. 6, p. 1407, 2016.

PERSSON, T.; POPESCU, B. O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail?. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.

PESIC, M.; GRETEN, F. R. Inflammation and cancer: tissue regeneration gone awry. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 43, p. 55-61, 2016.

PHILIPOVA, I.; VALCHEVA, V.; MIHAYLOVA, R.; MATEEVA, M.; DOYTCHINOVA, I.; STAVRAKOV, G. Synthetic piperine amide analogs with antimycobacterial activity. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 91, n. 3, p. 763-768, 2018.

PIETRAS, K.; ÖSTMAN, A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 8, p. 1324-1331, 2010.

PIKOR, L.; THU, K.; VUCIC, E.; LAM, W. The detection and implication of genome instability in cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 32, n. 3-4, p. 341-352, 2013.

PISKA, K.; GUNIA-KRZYŻAK, A.; KOCZURKIEWICZ, P.; WÓJCIK-PSZCZOŁA, K.; PEKALA, E. Piperlongumine (piplartine) as a lead compound for anticancer agents—Synthesis and properties of analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2018.

PIYACHATURAWAT, P.; GLINSUKON, T.; TOSKULKAO, C. Acute and subacute toxicity of piperine in mice, rats and hamsters. **Toxicology Letters**, v. 16, n. 3-4, p. 351-359, 1983.

PONGKORPSAKOL, P.; WONGKRASANT, P.; KUMPUN, S. CHATSUDTHIPONG, V.; MUANPRASAT, C. Inhibition of intestinal chloride secretion by piperine as a cellular basis for the anti-secretory effect of black peppers. **Pharmacological Research**, v. 100, p. 271-280, 2015.

PONTICELLI, C.; ESCOLI, R.; MORONI, G. Does cyclophosphamide still play a role in glomerular diseases?. **Autoimmunity Reviews**, 2018.

PORTUGAL, L. M. **Avaliação da eficácia antitumoral e toxicidade de lipossomas pH sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina no tratamento de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich**. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas René Rachou, 2012.

PRADO, R. R.; MENDONÇA, E. P.; MONTEIRO, G. P.; MELO, R. T.; ROSSI, D. A. Eritrograma em Medicina Veterinária: Apostila. **PUBVET**, v. 10, n. 1, p. 61-82, 2016.

PUNDIR, C. S.; JAKHAR, S.; NARWAL, V. Determination of urea with special emphasis on biosensors: A Review. **Biosensors and Bioelectronics**, 2018.

QI, L.; YU, H.; ZHANG, Y.; ZHAO, D.; LV, P.; ZHONG, Y.; XU, Y. IL-10 secreted by M2 macrophage promoted tumorigenesis through interaction with JAK2 in glioma. **Oncotarget**, v. 7, n. 44, p. 71673, 2016.

QIAN, B.; LI, J.; ZHANG, H.; KITAMURA, T.; ZHANG, J.; CAMPION, L. R.; KAISER, E. A.; SNYDER, L. A.; POLLARD, J. W. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. **Nature**, v. 475, n. 7355, p. 222, 2011.

QUINN, J. G.; TANSEY, E. A.; JOHNSON, C. D.; ROE, S. M.; MONTGOMERY, L. E. A. Blood: tests used to assess the physiological and immunological properties of blood. **Advances in Physiology Education**, v. 40, n. 2, p. 165-175, 2016.

QUISPE-TINTAYA, W.; LEE, M.; DONG, X.; WEISER, D. A.; VIJG, J.; MASLOV, A. Y. Bleomycin-induced genome structural variations in normal, non-tumor cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 16523, 2018.

RAFIQ, R. A.; GANAI, B. A.; TASDUQ, S. A. Piperine promotes ultraviolet (UV)-B-induced cell death in B16F10 mouse melanoma cells through modulation of major regulators of cell survival. **RSC Advances**, v. 5, n. 16, p. 11884-11894, 2015.

RAJ, L.; IDE, T.; GURKAR, A. U.; FOLEY, M.; SCHENONE, M.; LI, X.; TOLLIDAY, N. J.; GOLUB, T. R.; CARR, S. A.; SHAMJI, A. F.; STERN, A. M.; MANDINOVA, A.; SCHREIBER, S. L.; LEE, S. W. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. **Nature**, v. 475, p. 231, 2011.

RAJI, M. A. Management of chemotherapy-induced side-effects. **The Lancet Oncology**, v. 6, n. 6, p. 357, 2005.

RAMÍREZ, M. F.; HUITINK, J. M.; CATA, J. P. Perioperative clinical interventions that modify the immune response in cancer patients. **Open Journal of Anesthesiology**, v. 3, n. 03, p. 133, 2013.

RANIERI, G.; PANTALEO, M.; PICCINNO, M.; RONCETTI, M.; MUTINATI, M.; MARECH, I.; PATRUNO, R.; RIZZO, A.; SCIORSCI, R. L Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in human and pet tumours with special reference to breast cancer: a comparative review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 88, n. 2, p. 293-308, 2013.

RAO, V. R. S.; SURESH, G.; RAO, R. R.; BABU, K. S.; CHASHOO, G.; SAXENA, A. K. RAO, J. M. Synthesis of piperine–amino acid ester conjugates and study of their cytotoxic activities against human cancer cell lines. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 1, p. 38-46, 2012.

RAPHAEL, I.; NALAWADE, S.; EAGAR, T. N.; FORSTHUBER, T. G. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. **Cytokine**, v. 74, n. 1, p. 5-17, 2014.

REEN, R. K.; WIEBEL, F. J.; SINGH, J. Piperine inhibits aflatoxin B1-induced cytotoxicity and genotoxicity in V79 Chinese hamster cells genetically engineered to express rat cytochrome P4502B1. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, n. 3, p. 165-173, 1997.

RESHMI, S. K.; SATHYA, E.; DEVI, P. S.. Isolation of piperdine from *Piper nigrum* and its antiproliferative activity. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 15, p. 1535-1546, 2010.

RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FOSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. **ATLA**, v. 21, p. 89-96, 1993.

REUTER, M. A.; POMBO, C.; BETTS, M. R. Cytokine production and dysregulation in HIV pathogenesis: lessons for development of therapeutics and vaccines. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 23, n. 4-5, p. 181-191, 2012.

RIBEIRO, T. S.; FREIRE-DE-LIMA, L.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO L.; HEISE, N.; LIMA, M. E. F. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on

epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 13, p. 3555-3558, 2004.

RIVAS, M. N.; BURTON, O. T.; OETTGEN, H. C.; CHATILA, T. IL-4 production by group 2 innate lymphoid cells promotes food allergy by blocking regulatory T-cell function. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 3, p. 801-811. e9, 2016.

RIVERA, L. B.; MEYRONET, D.; HERVIEU, V.; FREDERICK, M. J.; BERGSLAND, E.; BERGERS, G. Intratumoral myeloid cells regulate responsiveness and resistance to antiangiogenic therapy. **Cell Reports**, v. 11, n. 4, p. 577-591, 2015.

RIZOV, M.; ANDREEVA, P.; DIMOVA, I. Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 56, n. 2, p. 127-132, 2017.

ROBLEK, M.; STRUTZMANN, E.; ZANKL, C.; ADAGE, T.; HEIKENWALDER, M.; ATLIC, A.; WEIS, R.; KUNGL, A.; BORSIG, L. Targeting of CCL2-CCR2-Glycosaminoglycan Axis Using a CCL2 decoy protein attenuates metastasis through inhibition of tumor cell seeding. **Neoplasia**, v. 18, n. 1, p. 49-59, 2016.

RODGERS, G.; DOUCETTE, C. D.; SOUTAR, D. A.; LIWSKI, R. S.; HOSKIN, D. W. Piperine impairs the migration and T cell-activating function of dendritic cells. **Toxicology Letters**, v. 242, p. 23-33, 2016.

RODRIGUES-JUNIOR, V. S.; MACHADO, P.; CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA, J. M.; ANDRADE, E. L.; BENTO, A. F.; CAMPOS, M. M.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. Preclinical safety evaluation of IQG-607 in rats: acute and repeated dose toxicity studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 86, p. 11-17, 2017.

ROLLINS, B. J.; SUNDAY, M. E. Suppression of tumor formation *in vivo* by expression of the JE gene in malignant cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 11, n. 6, p. 3125-3131, 1991.

ROYER, B. B.; BLANCHARD, F. Cytokines and bone cancers. In: HAYMANN, D. **Bone cancer: Primary Bone Cancers and Bone Metastases**. 2^a ed. Amsterdam: Elsevier, p. 103 – 110, 2015.

SALEEM, S.; KANNAN, R. R. Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery. **Cell Death Discovery**, v. 5, n. 1, p. 45, 2018.

SAMUEL, M.; OLIVER, S. V.; COETZEE, M.; BROOKE, B. D. The larvicidal effects of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine against insecticide resistant and susceptible strains of *Anopheles* malaria vector mosquitoes. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 238, 2016.

SAMPAIO, T. I. S.; MELO, N. C.; PAIVA, B. T. F.; ALELUIA, G. A. S.; NETO, F. L. P. S.; SILVA, H. R.; KEITA, H.; CRUZ, R. A. S.; SÁNCHEZ-ORTIZ, B. L.; PINEDA-PÉÑA, E. A.; BALDERAS, J. L.; NAVARRETE, A.; CARVALHO, J. C. T. Leaves of

Spondias mombin L. a traditional anxiolytic and antidepressant: Pharmacological evaluation on zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Ethnopharmacology**, 2018.

SANCHES, A. L. M.; VIEIRA, B. H.; REGHINI, M. V.; MOREIRA, R. A.; FREITAS, E. C.; ESPINDOLA, E. L. G.; DAAM, M. A. Single and mixture toxicity of abamectin and difenoconazole to adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 188, p. 582-587, 2017.

SANGWAN, P. L.; KOUL, J. L.; KOUL, S.; REDDY, M. V.; THOTA, N.; KHAN, I. A.; KUMAR, A.; KALIA, N. P.; QAZI, G. N. Piperine analogs as potent *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 22, p. 9847-9857, 2008.

SANTOS, N. A. G.; RODRIGUES, M. A. C.; MARTINS, N. M.; SANTOS, A. C. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 8, p. 1233-1250, 2012.

SANTOS, J. A. F. **Toxicidade e potencial antitumoral do análogo da piperina 2-oxo-2-(4-nitrofenilamina)-piperinoato de etila em modelo experimental de tumor ascítico de Ehrlich**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Área de concentração: Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

SANTOS, J.; BRITO, M.; FERREIRA, R.; MOURA, A. P.; SOUSA, T.; BATISTA, T.; MANGUEIRA, V.; LEITE, F.; CRUZ, R.; VIEIRA, G.; LIRA, B.; ATHAYDE-FILHO, P.; SOUZA, H.; COSTA, N.; VERAS, R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAGALHÃES, H.; SOBRAL, M. Th1-Biased Immunomodulation and *In Vivo* Antitumor Effect of a Novel Piperine Analogue. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2594, 2018.

SATO, K.; WATANABE, S.; OHTSUBO, A.; SHOJI, S.; ISHIKAWA, D.; TANAKA, T.; NOZAKI, K.; KONDO, R.; OKAJIMA, M.; MIURA, S.; TANAKA, J.; SAKAGAMI, T.; KOYA, T.; KAGAMU, H.; YOSHIZAWA, H.; NARITA, I. Nephrotoxicity of cisplatin combination chemotherapy in thoracic malignancy patients with CKD risk factors. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 222, 2016.

SATTARINEZHAD, E.; BORDBAR, A.; FANI, N. Piperine derivatives as potential inhibitors of Survivin: an *in silico* molecular docking. **Computers in Biology and Medicine**, v. 63, p. 219-227, 2015.

SCHAAF, M. B.; GARG, A. D.; AGOSTINIS, P. Defining the role of the tumor vasculature in antitumor immunity and immunotherapy. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 2, p. 115, 2018.

SCHAUB, F. X.; DHANKANI, V.; BERGER, A. C.; TRIVEDI, M.; RICHARDSON, A. B.; SHAW, R.; ZHAO, W.; ZHANG, X.; VENTURA, A.; LIU, Y.; AYER, D. E.; HURLIN, P. J.; CHERNIACK, A. D.; EISENMAN, R. N.; BERNARD, B.; GRANDORI, C. Pan-cancer Alterations of the MYC Oncogene and Its Proximal Network across the Cancer Genome Atlas. **Cell Systems**, v. 6, n. 3, p. 282-300. e2, 2018.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565-1570, 2011.

SCHUMACKER, P. T. Reactive oxygen species in cancer: a dance with the devil. **Cancer Cell**, v. 27, n. 2, p. 156-157, 2015.

SCHÜNEMANN, M.; ANKER, S. D.; RAUCHHAUS, M. Cancer fatigue syndrome reflects clinically non-overt heart failure: an approach towards oncocardiology. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 5, n. 11, p. 632, 2008.

SCICINSKI, J.; ORONSKY, B.; NING, S.; KNOX, S.; PEEHL, D.; KIM, M. M.; LANGECKER, P.; FANGER, G. NO to cancer: The complex and multifaceted role of nitric oxide and the epigenetic nitric oxide donor, RRx-001. **Redox Biology**, v. 6, p. 1-8, 2015.

SCOTT, A. M.; WOLCHOK, J. D.; OLD, L. J. Antibody therapy of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 278, 2012.

SEGNER, H. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 187-195, 2009.

SELVENDIRAN, K.; SINGH, J. P. V.; SAKTHISEKARAN, D. *In vivo* effect of piperine on serum and tissue glycoprotein levels in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 19, n. 2, p. 107-111, 2006.

ŞEN, E.; ÖNER, İ.; ATA, Ö. Imatinib and hypophosphatemia: Case report and review of literature. **Journal of Oncological Sciences**, v. 3, n. 2, p. 92-95, 2017.

SEVKO, A.; MICHELS, T.; VROHLINGS, M.; UMANSKY, L.; BECKHOVE, P.; KATO, M.; SHURIN, G. V.; SHURIN, M. R.; UMANSKY, V. Antitumor effect of paclitaxel is mediated by inhibition of myeloid-derived suppressor cells and chronic inflammation in the spontaneous melanoma model. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 5, p. 2464-2471, 2013.

SHARMA, A.; HOUSHYAR, R.; BHOSALE, P.; CHOI, J.; GULATI, R.; LALL, C.; Chemotherapy induced liver abnormalities: an imaging perspective. **Clinical and Molecular Hepatology**, v. 20, n. 3, p. 317, 2014.

SHARMA, B.; DHAMIJA, I.; KUMAR, S.; CHAUDHARY, H. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antitumor activity of methanolic extract of *Argyrea nervosa* leaves on Ehrlich ascites carcinoma. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 10, n. 2, p. 399-408, 2015.

SHARMA, N.; TOOR, D. Interleukin-10: role in increasing susceptibility and pathogenesis of rheumatic fever/rheumatic heart disease. **Cytokine**, v. 90, p. 169-176, 2017.

SHAY, J. W. Role of telomeres and telomerase in aging and cancer. **Cancer Discovery**, v. 6, n. 6, p. 584-593, 2016.

SHERBET, G.V. Angiogenesis in Neoplasia and Anti-Angiogenesis Strategy in the Control of Tumour Growth and Metastasis. In: SHERBET, G.V. **Molecular Approach to Cancer Management**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2017.

SHI, W.; GUO, L.; KASDAN, H.; TAI, Y. Four-part leukocyte differential count based on sheathless microflow cytometer and fluorescent dye assay. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 7, p. 1257-1265, 2013.

SHIELDS, M. Chemotherapeutics. In: MCCREATH, S.B.; DELGODA, R. Pharmacognosy: **Fundamentals, Applications and Strategies**. Amsterdam: Elsevier, p. 295 – 313, 2017.

SHRIVASTAVA, P.; VAIBHAV, K.; TABASSUM, R.; KHAN, A.; ISHRAT, T.; KHAN, M. M.; AHMAD, A.; ISLAM, F.; SAFHI, M. M.; ISLAM, F. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effect of Piperine on 6-OHDA induced Parkinson's rat model. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 680-687, 2013.

SHROFF, E. H.; EBERLIN, L. S.; DANG, V. M.; GOUW, A. M.; GABAY, M.; ADAM, S. J.; BELLOVIN, D. I.; TRAN, P. T.; PHILBRICK, W. M.; GARCIA-OCANA, A.; CASEY, S. C.; LI, Y.; DANG, C. V.; ZARE, R. N.; FELSHER, D. W. MYC oncogene overexpression drives renal cell carcinoma in a mouse model through glutamine metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 21, p. 6539-6544, 2015.

SOHN, S.; KIM, S. Y.; KIM, H. S.; CHUN, Y.; HAN, S. Y.; KIM, S. H.; MOON, A. *In vitro* evaluation of biomarkers for cisplatin-induced nephrotoxicity using HK-2 human kidney epithelial cells. **Toxicology Letters**, v. 217, n. 3, p. 235-242, 2013.

SHUPTRINE, C. W.; SURANA, R.; WEINER, L. M. Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, p. 3-13, 2012.

SI, L.; YANG R.; LIN, R.; YANG S. Piperine functions as a tumor suppressor for human ovarian tumor growth via activation of JNK/p38 MAPK-mediated intrinsic apoptotic pathway. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 3, p. BSR20180503, 2018.

SIDDIQUI, S.; AHAMAD, M. S.; JAFRI, A.; AFZAL, M.; ARSHAD, M. Piperine triggers apoptosis of human oral squamous carcinoma through cell cycle arrest and mitochondrial oxidative stress. **Nutrition and Cancer**, v. 69, n. 5, p. 791-799, 2017.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7-30, 2018.

SIEMANN, D. W.; HORSMAN, M. R. Modulation of the tumor vasculature and oxygenation to improve therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 153, p. 107-124, 2015.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 715-748, 2017.

SIES, H. On the history of oxidative stress: concept and some aspects of current development. **Current Opinion in Toxicology**, 2018.

SILVA, G. H.; CLEMENTE, Z.; KHAN L. U.; COA, F.; NETO, L. L. R.; CARVALHO, H. W. P.; CASTRO, V. L.; MARTINEZ, D. S. T.; MONTEIRO, R. T. R. Toxicity assessment of TiO₂-MWCNT nanohybrid material with enhanced photocatalytic activity on *Danio rerio* (Zebrafish) embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 165, p. 136-143, 2018.

SIMHAM, S.; BASHA S. C.; KUMAR, K. S.; HAJIVALLI, S.; SINGOTAM, M.; KUMAR, A. Anthelmintic activity of piperine from black pepper. **Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 1013-1017, 2013.

SINGH, J.; REEN, R. K.; WIEBEL, F. J. Piperine, a major ingredient of black and long peppers, protects against AFB₁-induced cytotoxicity and micronuclei formation in H4IIEC3 rat hepatoma cells. **Cancer Letters**, v. 86, n. 2, p. 195-200, 1994.

SISODIYA, P. S. Plant derived anticancer agents: a review. **International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences**, v. 2, n. 2, p. 293-308, 2013.

SKARIA, T., BURGENER, J.; BACHLI, E.; SCHOEDON, G. IL-4 causes hyperpermeability of vascular endothelial cells through Wnt5A signaling. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0156002, 2016.

SMITH, S; PREWETT, S. Principles of chemotherapy and radiotherapy. **Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine**, v. 27, n. 7, p. 206-212, 2017.

SOBOLEWSKA, B.; GOLENKO, J.; POESCHEL, S.; GRIMMEL, C.; GATSIU, A.; SOPOVA, K.; BIEDERMANN, T.; SCHENKE-LAYLAND, K.; STELLOS, K.; ZIEMSEN, F. Influence of aflibercept on platelet activation profile. **Experimental Eye Research**, v. 175, p. 166-172, 2018.

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH, H.; LLEONART, M. E. Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 376-390, 2013.

SOUSA, T. K. G. **Estudo da toxicidade e potencial antitumoral do análogo da piperina 2-oxo-2-(4-etilfenilamina)-piperinoato de etila**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Área de concentração: Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

SOUTAR, D. A.; DOUCETTE, C. D.; LIWSKI, R. S.; HOSKIN, D. W. Piperine, a pungent alkaloid from black pepper, inhibits B lymphocyte activation and effector functions. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 3, p. 466-474, 2017.

SPANIO, D.; ZOLLO, M. Tumor microenvironment: a main actor in the metastasis process. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 29, n. 4, p. 381-395, 2012.

SPOSITO, J. C. V.; MONTAGNER, C. C.; CASADO, M.; NAVARRO-MARTÍN, L.; SOLÓRZANO, J. C. J.; PIÑA, B.; GRISOLIA, A. B. Emerging contaminants in Brazilian rivers: Occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Chemosphere**, 2018.

STELZER, J. A. A.; ROSIN, C. K.; BAUER, L. H.; HARTMANN, M.; PULGATI, F. H.; ARENZON, A. Is it Fish Embryo Test (FET) According to OECD 236 Sensible Enough for Delivering Quality Data for Effluent Risk Assessment?. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2018.

STEWART, C. L. M; PASHA, T. Laboratory tests of renal function. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, 2018.

STRIZ, I. Cytokines of the IL-1 family: recognized targets in chronic inflammation underrated in organ transplantations. **Clinical Science**, v. 131, n. 17, p. 2241-2256, 2017.

SU, Z.; YANG, Z.; XU, Y.; CHEN, Y.; YU, Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, p. 48, 2015.

SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 2-3, p. 339-346, 2004.

SUZUKI, A.; LELAND, P.; JOSHI, B. H.; PURI, R. K. Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy. **Cytokine**, v. 75, n. 1, p. 79-88, 2015.

SYED, S. B.; ARYA, H.; FU, I.; YEH, T.; PERIYASAMY, L.; HSIEH, H.; COUMAR, M. S. Targeting P-glycoprotein: Investigation of piperine analogs for overcoming drug resistance in cancer. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7972, 2017.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 157-170, 2013.

TAK, J.; LEE, J.; PARK, J. Resveratrol and piperine enhance radiosensitivity of tumor cells. **BMB Reports**, v. 45, n. 4, p. 242-246, 2012.

TAKAHASHI, M.; MIYAZAKI, H.; FURIHATA, M.; SAKAI, H.; KONAKAHARA, T.; WATANABE, M.; OKADA, T. Chemokine CCL2/MCP-1 negatively regulates metastasis in a highly bone marrow-metastatic mouse breast cancer model. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 26, n. 7, p. 817, 2009.

TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. **Cancer Research**, v. 70, n. 14, p. 5649-5669, 2010.

TAN, W. P.; LIN, C.; CHEN, M.; DEANE, L. A. Periprostatic fat: a risk factor for prostate cancer?. **Urology**, v. 98, p. 107-112, 2016.

TAN, Q.; HUANG, Q.; MA, Y. L.; MAO, K.; YANG, G.; LUO, P.; MA, G.; MEI, P.; JIN, Y. Potential Roles of IL-1 Subfamily Members in Glycolysis in Disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 2018.

TANAKA, T.; SHIMIZU, M.; KOCHI, T.; MORIWAKI, H. Chemical-induced carcinogenesis. **Journal of Experimental & Clinical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 203-209, 2013.

TANG, D.; TAO, D.; FANG, Y.; DENG, C.; XU, Q.; ZHOU, J. TNF-alpha promotes invasion and metastasis via NF-kappa B pathway in oral squamous cell carcinoma. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 23, p. 141, 2017.

TAVARES, W. S.; CRUZ, I.; PETACCI, F.; FREITAS, S. S.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C. Insecticide activity of piperine: Toxicity to eggs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) and phytotoxicity on several vegetables. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 21, p. 5301-5306, 2011.

THIEL, A.; BUSKENS, C.; WOEHRLE, T.; ETHEVE, S.; SCHOENMARKES, A.; FEHR, M.; BEILSTEIN, P. Black pepper constituent piperine: Genotoxicity studies *in vitro* and *in vivo*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 66, p. 350-357, 2014.

THOMAS, S. A.; GRAMI, Z. G.; MEHTA, S.; PATEL, K. Adverse effects of 5-fluorouracil: Focus on rare side effects. **Cancer Cell & Microenvironment**, v. 3, n. 2, 2016.

TREPS, L.; CONRADI, L. C.; HARJES, U.; CARMELIET, P. Manipulating Angiogenesis by Targeting Endothelial Metabolism: Hitting the Engine Rather than the Drivers—A New Perspective?. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 3, p. 872-887, 2016.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p. 133, 2003.

TSAUR, I.; RUTZ, J.; MAKAREVIC, J.; JUENGEL, E.; GUST, K. M.; BORGMANN, H.; SCHILLING, D.; NELSON, K.; HAFERKAMP, A.; BARTSCH, G.; BLAHETA, R. A. CCL2 promotes integrin-mediated adhesion of prostate cancer cells in vitro. **World Journal of Urology**, v. 33, n. 7, p. 1051-1056, 2015.

TOI, M.; BICKNELL, R.; HARRIS, A. L. Inhibition of colon and breast carcinoma cell growth by interleukin-4. **Cancer Research**, v. 52, n. 2, p. 275-279, 1992.

TOKUMO, K.; MASUDA, T.; MASUDA, T.; MASUDA, T.; MIYAMA, T.; MIURA, S.; YAMAGUCHI, K.; SAKAMOTO, S.; HORIMASU, Y.; NAKASHIMA, T.; MIYAMOTO, S.; YOSHIDA, T.; IWAMOTO, H.; FUJITAKA, K.; HAMADA, H.; HATTORI, N. Nivolumab-induced severe pancytopenia in a patient with lung adenocarcinoma. **Lung Cancer**, v. 119, p. 21-24, 2018.

TONG, H.; ISENRING, E.; YATES, P. The prevalence of nutrition impact symptoms and their relationship to quality of life and clinical outcomes in medical oncology patients. **Supportive Care in Cancer**, v. 17, n. 1, p. 83-90, 2009.

TONG, L.; CHUANG, C.; WU, S.; ZUO, L. Reactive oxygen species in redox cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 367, n. 1, p. 18-25, 2015.

UEDA, S.; MASUTANI, H.; NAKAMURA, H.; TANAKA, T.; UENO, M.; YODOI, J. Redox control of cell death. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 4, p. 405-414, 2002.

UMADEVI, P.; DEEPTI, K.; VENUGOPAL, D. V.R. Synthesis, anticancer and antibacterial activities of piperine analogs. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 11, p. 5466-5471, 2013.

VAKILIAN, A.; KHORRAMDELAZAD, H.; HEIDARI, P.; REZAEI, Z. S.; HASSANSHAHI, G. CCL2/CCR2 signaling pathway in glioblastoma multiforme. **Neurochemistry International**, v. 103, p. 1-7, 2017.

VASALA, A.; NAIR, H.; RAO, T. S.; MURTHY, S. S.; TAGORE, R.; AHMED, F. Role of angiogenesis in colorectal carcinomas using VEGF and BCL2: An IHC study. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 31, p. 41, 2017.

VENKATESAN, N.; RAMANATHAN, M. Preclinical Toxicity Studies-Tool of Drug Discovery. **PVPE**, v. 1, p. 1-7, 2017.

VENUGOPAL, D. V.R.; YARLA, N. S.; UMADDEV, P. Synthesis, of Novel Piperine Analogs of Dipeptidyl Boronic Acid as Antimicrobial and Anticancer Agents. **Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 9, p. 606-610, 2014.

VIALARD, C.; LARRIVÉE, B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. **Angiogenesis**, v. 20, n. 4, p. 409-426, 2017.

VICHAYA, E. G.; CHIU, G. S.; KRUKOWSKI, K.; LACOURT, T. E.; KAVELAARS, A.; DANTZER, R.; HEIJNEN, C. J.; WALKER, A. K. Mechanisms of chemotherapy-induced behavioral toxicities. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, p. 131, 2015.

VIVIANO, M.; ROSSI, M.; COCCA, S. A rare case of osteonecrosis of the jaw related to imatinib. **Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 43, n. 2, p. 120-124, 2017.

VOLPERT, O. V.; FONG, T.; KOCH, A. E.; PETERSON, J. D.; WALTEBAUGH, C.; TEPPER, R. I.; BOUCK, N. P. Inhibition of angiogenesis by interleukin 4. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 6, p. 1039-1046, 1998.

VORON, T.; MARCHETEAU, E.; PERNOT, S.; COLUSSI, O.; TARTOUR, E.; TAIEB, J.; TERME, M. Control of the immune response by pro-angiogenic factors. **Frontiers in Oncology**, v. 4, p. 70, 2014.

VORONOV, E.; APTE, R. N. IL-1 in colon inflammation, colon carcinogenesis and invasiveness of colon cancer. **Cancer Microenvironment**, v. 8, n. 3, p. 187-200, 2015.

WANG, D.; DUBOIS, R. N. Immunosuppression associated with chronic inflammation in the tumor microenvironment. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 10, p. 1085-1093, 2015.

WANG, S. L.; LEE, J. J.; LIAO, A. T. Chemotherapy-induced neutropenia is associated with prolonged remission duration and survival time in canine lymphoma. **The Veterinary Journal**, v. 205, n. 1, p. 69-73, 2015.

WANG, Z.; DABROSIN, C.; YIN, X.; FUSTER, M. M.; ARREOLA, A.; RATHMELL, W. K.; GENERALI, D.; NAGARAJU, G. P.; EL-RAYES, B.; RIBATTI, D.; CHEN, Y. C.; HONOKI, K.; FUJII, H.; GEORGAKILAS, A. G.; NOWSHEEN, S.; AMEDEI, A.; NICCOLAI, E.; AMIN, A.; JENSEN, L. D. Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy. In: **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S224-S243, 2015.

WANG, H.; FRANCO, F.; HO, P. Metabolic regulation of Tregs in cancer: opportunities for immunotherapy. **Trends in Cancer**, v. 3, n. 8, p. 583-592, 2017.

WANG, N.; JAIN, R. K.; BATCHELOR, T. T. New directions in anti-angiogenic therapy for glioblastoma. **Neurotherapeutics**, v. 14, n. 2, p. 321-332, 2017.

WANG, C.; JIA, H.; ZHU, L.; ZHANG, H.; WANG, Y. Toxicity of α -Fe₂O₃ nanoparticles to *Artemia salina* cysts and three stages of larvae. **Science of the Total Environment**, v. 598, p. 847-855, 2017.

WANG-SHENG, C.; JIE, A.; JIAN-JUN, L.; LAN, H.; ZENG-BAO, X.; CHANG-QING, L. Piperine attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses in BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v. 42, p. 44-48, 2017.

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. **Science Signaling**, v. 3, n. 105, p. cm1-cm1, 2010.

WEN, H.; DAN, M.; YANG, Y.; LYU, J.; SHAO, A.; CHENG, X.; CHEN, L.; XU, L. Acute toxicity and genotoxicity of silver nanoparticle in rats. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0185554, 2017.

WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, v. 27, n. 45, p. 5904, 2008.

WICKI, A.; CHRISTOFORI, G. The angiogenic switch in tumorigenesis. In: **Tumor Angiogenesis**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. p. 67-88.

WU, T.T.; ZHOU, S.H. Nanoparticle-based targeted therapeutics in head-and-neck cancer. **International Journal of Medical Sciences**, v. 12, n. 2, p. 187, 2015.

WU, A. A.; DRAKE, V.; HUANG, H.; CHIU, S.; ZHENG, L. Reprogramming the tumor microenvironment: tumor-induced immunosuppressive factors paralyze T cells. **Oncoimmunology**, v. 4, n. 7, p. e1016700, 2015.

WU, S.; POWERS, S.; ZHU, W.; HANNUN, Y. A. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. **Nature**, v. 529, n. 7584, p. 43, 2016.

WU, T.; DAI, Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. **Cancer Letters**, v. 387, p. 61-68, 2017.

WU, X.; GOWDA, N. M.; KAWASAWA, Y. I.; GOWDA, D. C. A malaria protein factor induces IL-4 production by dendritic cells via PI3K-Akt-NF- κ B signaling independent of MyD88/TRIF and promotes Th2 response. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. AC118. 001720, 2018.

XU, H. M. Th1 cytokine-based immunotherapy for cancer. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v. 13, n. 5, p. 482-494, 2014.

XU, Q.; HIGGINS, T.; CEMBROWSKI, G. S. Limiting the testing of AST: a diagnostically nonspecific enzyme. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 144, n. 3, p. 423-426, 2015.

YAACOUB, K.; PEDEUX, R.; TARTE, K.; GUILLAUDEUX, T. Role of the tumor microenvironment in regulating apoptosis and cancer progression. **Cancer Letters**, v. 378, n. 2, p. 150-159, 2016.

YADAV, L.; PURI, N.; RASTOGI, V.; SATPUTE, P.; SHARMA, V. Tumour angiogenesis and angiogenic inhibitors: A review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**, v. 9, n. 6, p. XE01, 2015.

YAFFE, P. B.; DOUCETTE, C. D.; WALSH, M.; HOSKIN, D. W.. Piperine impairs cell cycle progression and causes reactive oxygen species-dependent apoptosis in rectal cancer cells. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 94, n. 1, p. 109-114, 2013.

YAN, J.; SMYTH, M. J.; TENG, M. W. L. Interleukin (IL)-12 and IL-23 and their conflicting roles in cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 7, p. a028530, 2018.

YAO, M.; BRUMMER, G.; ACEVEDO, D.; CHENG, N. Cytokine regulation of metastasis and tumorigenicity. **Advances in Cancer Research**, v. 132, p. 265-367, 2016.

Yaqub, A.; ANJUM, K. M.; MUNIR, A.; MUKHTAR, H.; KHAN, W. A. Evaluation of acute toxicity and effects of sub-acute concentrations of copper oxide nanoparticles (CuO-NPs) on hematology, selected enzymes and histopathology of liver and kidney in *Mus musculus*. **Indian Journal of Animal Research**, v. 52, n. 1, p. 92-98, 2018.

YOKOYAMA, C.; SUEYOSHI, Y.; EMA, M.; MORI, Y.; TAKAISHI, K.; HISATOMI, H. Induction of oxidative stress by anticancer drugs in the presence and absence of cells. **Oncology Letters**, v. 14, n. 5, p. 6066-6070, 2017.

YOSHIMURA, T.; HOWARD, O. M. Z.; ITO, T.; KUWABARA, M.; MATSUKAWA, A.; CHEN; K. LIU, Y.; LIU, M.; OPPENHEIM, J. J.; WANG, J. M. Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 produced by stromal cells promotes lung metastasis of 4T1 murine breast cancer cells. **PloS One**, v. 8, n. 3, p. e58791, 2013.

YU, S.; JIA, L.; ZHANG, Y.; ZHONG, J.; YANG, B.; WU, C. IL-12 induced the generation of IL-21-and IFN- γ -co-expressing poly-functional CD4⁺ T cells from human naive CD4⁺ T cells. **Cell Cycle**, v. 14, n. 21, p. 3362-3372, 2015.

ZACHARIA, L. C. Permitted Daily Exposure of the Androgen Receptor Antagonist Flutamide. **Toxicological Sciences**, v. 159, n. 2, p. 279-289, 2017.

ZAMARRON, B. F.; CHEN, W. J. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 5, p. 651, 2011.

ZHANG, J. ZHU, X.; LI, H.; LI, B.; SUN, L.; XIE, T.; ZHU, T.; ZHOU, H.; YE, Z. Piperine inhibits proliferation of human osteosarcoma cells via G2/M phase arrest and metastasis by suppressing MMP-2/-9 expression. **International Immunopharmacology**, v. 24, n. 1, p. 50-58, 2015.

ZHANG, G.; GUO, X.; ZHANG, G. Limiting the testing of urea: Urea along with every plasma creatinine test?. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 31, n. 5, p. e22103, 2017.

ZHANG, C.; WANG, J.; ZHANG S. ;ZHU, L.; DU, Z.; WANG, J. Acute and subchronic toxicity of pyraclostrobin in zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 188, p. 510-516, 2017.

ZHAO, N.; IRAMINA, K.; CHEN, X. A 3d coupled mathematical model for the growth of avascular solid tumor. **Journal of Mechanics in Medicine and Biology**, v. 15, n. 03, p. 1550024, 2015.

ZENG, Y.; YANG, Y. Piperine depresses the migration progression via downregulating the Akt/mTOR/MMP-9 signaling pathway in DU145 cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 5, p. 6363-6370, 2018.

ZHOU, X.; LI, Z.; ZHOU, J. Tumor necrosis factor α in the onset and progression of leukemia. **Experimental Hematology**, v. 45, p. 17-26, 2017.

ZHOU, S.; WEI, Z.; CHU, T.; YU, H.; LI, S.; ZANG, W.; GUI, W. Transcriptomic analysis of zebrafish (*Danio rerio*) embryos to assess integrated biotoxicity of Xitiaoxi River waters. **Environmental Pollution**, 2018.

ZUNDLER, S.; NEURATH, M. F. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 5, p. 559-568, 2015.

Anexos

ANEXOS

ANEXO A- Certidão da Comissão de Ética no Uso de Animais para camundongos Swiss (*Mus musculus*)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO (2ª VIA)

Certificamos que o projeto intitulado “INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE NÃO-CLÍNICA E DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE NOVOS DERIVADOS ACRIDÍNICOS, QUINOLÍNICOS, PIPERÍNICOS E TIOFÊNICOS” protocolo nº 110/2017 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Marianna Vieira Sobral – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) em reunião de 05/10/2017. Com aprovação “*ad referendum*” de adendo em 23/07/2018.

Vigência do Projeto	2017 - 2019
Espécie/linhagem	<i>Mus musculus</i> / Swiss
Número de animais	354 animais
Idade/peso	6 – 8 semanas/ 28 - 32 g
Sexo	Fêmeas
Origem	Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM - UFPB

Profa. Dra. Islânia Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da CEUA-UFPB

ANEXO B - Certidão da Comissão de Ética no Uso de Animais para peixe-zebra (*Danio rerio*)



Universidade
Federal da
Paraíba



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NOVOS ANÁLOGOS SINTÉTICOS PIPERIDÍNICOS, QUINOLÍNICOS E ACRIDÍNICOS EM MODELO DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)", protocolada sob o CEUA nº 5900310718 (ID 000348), sob a responsabilidade de **Marianna Vieira Sobral e equipe; Davi Felipe Farias; Rafael Carlos Ferreira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 06/09/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF TOXICITY OF NEW SYNTHETIC PIPERIDINIC, QUINOLINIC AND ACRIDINE ANALOGS IN PEIXE-ZEBRA MODEL (*Danio rerio*)", utilizing 2400 Fishes (males and females), protocol number CEUA 5900310718 (ID 000348), under the responsibility of **Marianna Vieira Sobral and team; Davi Felipe Farias; Rafael Carlos Ferreira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 09/06/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2018** a **09/2021** Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem: **Unidade de Produção de Organismos Modelo Não Convencionais (UniPOM)**

Espécie: **Peixes** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **1 a 3 horas** N: **2400**

Linhagem: **Danio rerio** Peso: **0 a 0 g**

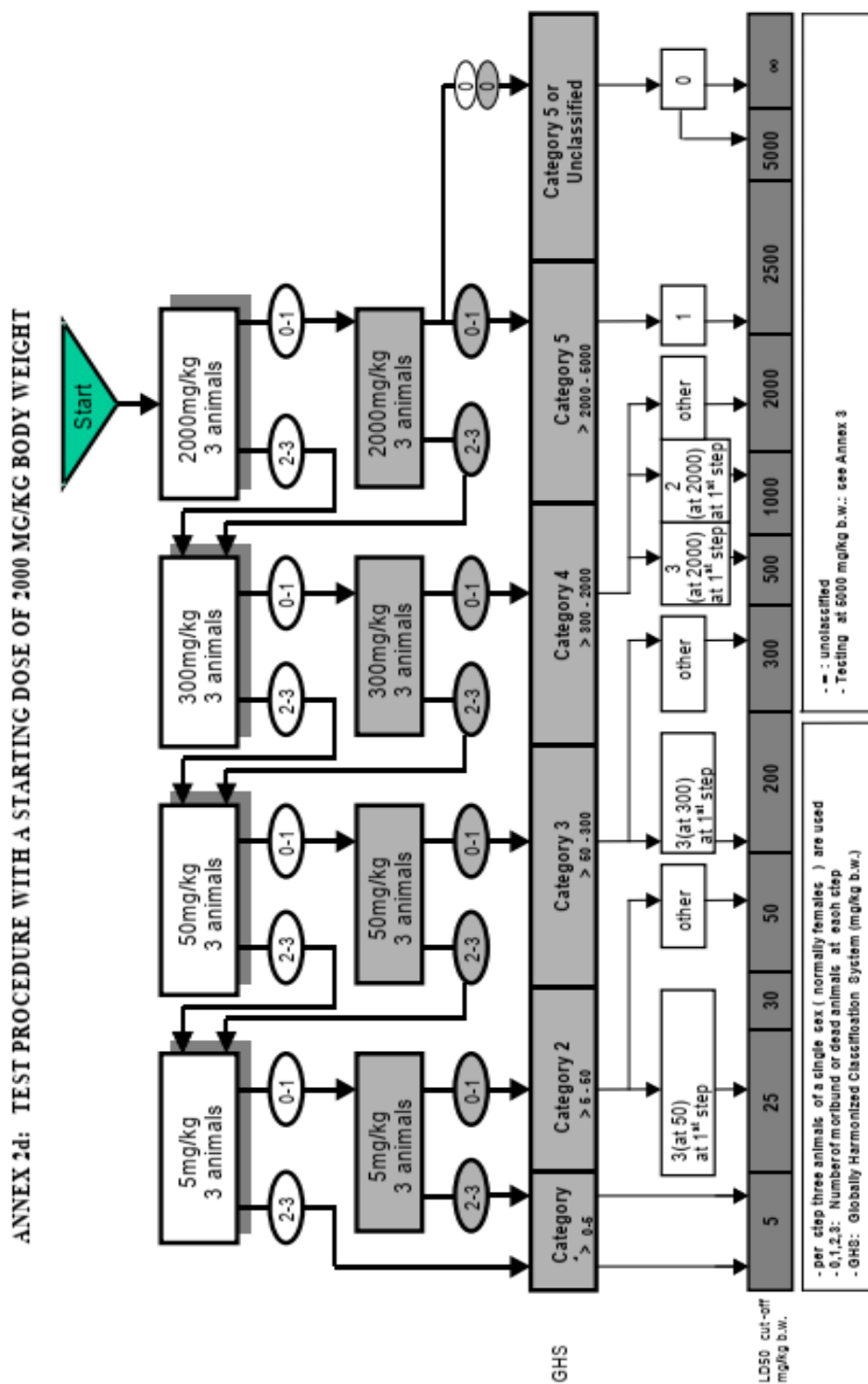
Local do experimento: Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias (LabRisco). Este laboratório divide o espaço experimental com a UniPOM.

João Pessoa, 28 de dezembro de 2018

Profa. Dra. Islania Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

ANEXO C - Fluxograma de realização do teste de toxicidade aguda com uma dose inicial de 2000 mg/kg



Fonte: OECD. Test nº 423: Acute oral toxicity – acute toxic class method, 2001.